



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAÍS MARQUES AMORIM

**IMUNOENSAIO ic-ELISA DESENVOLVIDO PARA
AFLATOXINA:
DETECÇÃO DE NÍVEIS RESIDUAIS E QUALIDADE DE OVO
DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ-BR**

THAÍS MARQUES AMORIM

**IMUNOENSAIO ic-ELISA DESENVOLVIDO PARA
AFLATOXINA:
DETECÇÃO DE NÍVEIS RESIDUAIS E QUALIDADE DE OVO
DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ-BR**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka

Co-orientadora: Dra. Cássia Reika Takabayashi Yamashita

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Amorim, Thaís Marques .

Imunoensaio ic-ELISA desenvolvido para aflatoxina: detecção de níveis residuais e qualidade de ovo da Região Norte do Paraná-BR / Thaís Marques Amorim. - Londrina, 2017.

84 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Coorientador: Cássia Reika Takabayashi Yamashita.

dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Imunoensaio - 2. Aflatoxinas - 3. Detecção - I. Hirooka, Elisa Yoko. II. Yamashita, Cássia Reika Takabayashi . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

THAÍS MARQUES AMORIM

**IMUNOENSAIO ic-ELISA DESENVOLVIDO PARA AFLATOXINA:
DETECÇÃO DE NÍVEIS RESIDUAIS E QUALIDADE DE OVO DA
REGIÃO NORTE DO PARANÁ-BR**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre Oba
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de dezembro de 2017

*Aos meu pai Maurício e
minhas
irmãs Daianny e Juliana
pelo apoio
incondicion
al. Á minha filha, que me
motiva a
ser alguém
melhor. Á minha mãe,
Regione (in memorian),
por ser meu referencial em
perseverança, amor, fé e
superação.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Elisa Yoko Hirooka pela orientação, conhecimento transmitido, incentivo e apoio;

À Universidade Estadual de Londrina e aos professores do Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por todo aprendizado e incentivo;

À Coordenação e Chefia do Curso de Pós-graduação, pela atenção e colaboração;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado;

Ao Professor Dr. Osamu Kawamura de Kagawa University, Japão, pelo fornecimento de hibridomas e por todo conhecimento técnico repassado ao grupo de pesquisa;

À professora Dra. Marta Toledo Benassi pelo conhecimento transmitido e por todo apoio prestado;

Aos proprietários das duas granjas pelo apoio e fornecimento de amostras de ovos utilizadas neste trabalho;

Ao Responsável Técnico Geraldo Masahiro Hayashi por todo o apoio prestado e pelo intermédio junto aos proprietários das granjas;

Ao Doutor José Carlos Ribeiro Júnior pelo apoio prestado no início do projeto;

À Pós-Doutoranda Cássia Takabayashi Yamashita, pelos ensinamentos, pela paciência, pela ajuda com a padronização do imunoensaio e principalmente pela amizade;

À Pós-Doutoranda Angélica Tieme Ishikawa e à Doutoranda Lívia Montanheiro Médice Zanin, por cederem os anticorpos monoclonais, por todo apoio durante o mestrado e pela amizade;

Aos professores Dr. Guilherme Biz e Fábio Yamashita pela ajuda com a análise estatística.

À Mariana Ribeiro Befatti pela ajuda nas análises e pela amizade.

Aos colegas de laboratório Felipe Pedote Fracalossi, André Ribeiro da Silva, Gervásio Hitoshi, pela ajuda nas análises, pela troca de conhecimento e de experiências;

Às estagiárias Fernanda Ramos, Geovana de Souza Cardozo, Nathália Tatakihara, pela ajuda nas análises e colaboração;

Aos funcionários e técnicos do Depto. De Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Sandra Rezende, Alessandra, Rubens e Neuza pelo apoio;

Aos amigos Camila Campos Félix, Mayara de Souza Gois Barbosa, Milena Cristina Filla e Rodrigo José Gomes pela amizade, por toda ajuda, pelo apoio e todos os momentos de descontração;

Aos colegas do Programa de Mestrado e Doutorado, pelos momentos compartilhados;

Ao meu pai Maurício de Castro Amorim e minhas irmãs Daianny Marques Amorim e Juliana de Oliveira Amorim pela paciência, compreensão, ajuda e por sempre estarem presentes;

Às minhas amigas queridas Rayane Rodrigues Martins, Nair Mota da Costa e Thuany Alencar pela amizade, compreensão, apoio e incentivo;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

AMORIM, Thaís Marques. **Imunoensaio ic-ELISA desenvolvido para aflatoxina:** detecção de níveis residuais e qualidade de ovo da Região Norte do Paraná-BR. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A cadeia de produção brasileira de ovos destina-se principalmente a fornecer ovos para consumo direto in natura, mas também um ingrediente importante para a indústria de alimentos, devido as propriedades físico-químicas, com seu papel estabelecido em emulsificação, aeração, ligação e estabilização. Para evitar a contaminação por microorganismos patogênicos e níveis residuais de aflatoxina B₁, deve haver um rigoroso controle de qualidade em toda a cadeia produtiva. Amostras de ovo provenientes de duas granjas da região Norte do Paraná, no Brasil, foram avaliadas por meio de imunoensaio enzimático indireto competitivo (ic-ELISA), desenvolvido com anticorpo monoclonal (AcM) anti-aflatoxina B₁ previamente produzidos por uma cultura de hibridoma AF4 diluída (título 1: 30.000) e aplicada a ic-ELISA. A contaminação por aflatoxina AFB₁ foi analisada em 300 amostras de ovo coletadas aleatoriamente (n = 200 para a granja A e n = 100 para a granja B). A validação intra-laboratorial apresentou linearidade adequada (R² = 0,9922), com limites de detecção e quantificação de 0,38 µg/Kg e 0,71 µg/Kg, respectivamente. O ensaio desenvolvido apresentou baixa interferência de matriz (3,41 %), com taxas médias de recuperação 95,5; 101 e 99,2 % para os seguintes níveis de contaminação 1,0; 2,0 e 5,0 ng/g (CV de 12,0; 1,2 e 5,1 %), respectivamente. A precisão, avaliada por meio da repetibilidade (CV= 12,0 %) e precisão intermediária (CV=14,8 %), apresentou valores de acordo com o preconizado pela ANVISA, do Ministério da Saúde do Brasil. Do total de amostras analisadas na granja A, 7,5 % obtiveram nível de aflatoxina > LQ, com variação de 0,72 a 1,12 ug/Kg. A contaminação na granja B variou de 0,71 a 1,29 ug/Kg, com 14 % das amostras > LQ. Em relação ao perfil de qualidade do ovo, o peso médio do inteiro foi de 56,24 g ± 3,33 e 58,85 g ± 3,40 para as granjas A e B, respectivamente; o peso médio da gema foi de 16,72 g ± 1,41 para a granja A e 17,85 g ± 1,42 para a granja B; o peso da clara foi de 33,68 g ± 2,35 para a granja A e 34,98 g ± 2,93 para a granja B. A casca apresentou características macroscopicamente normais, com percentual de 10,40 % ± 0,86 para granja A, e para granja B o valor obtido foi de 10,24 % ± 0,71. E espessura da casca de 0,370 mm ± 0,04 e 0,373 mm ± 0,04 para a granja A e para a granja B, respectivamente. O imunoensaio ic-ELISA desenvolvido consistiu numa ferramenta de triagem de uso rápido, fácil e econômico, mostrando-se um método promissor para detecção de AFB₁ em ovo.

Palavras-chave: Ovo. Aflatoxina B₁. IC-ELISA. Método rápido. Triagem.

AMORIM, Thaís Marques. **Development and application of ic-ELISA:** immunoassay for aflatoxin: detection of residual levels and egg quality of the Northern Region of Paraná-BR. 2017. Dissertation (Masters in Food Science) - State University of Londrina, Londrina.

ABSTRACT

The Brazilian egg chain is mainly intended to provide direct consumption *in natura*, but it is also an important ingredient source in food industry due to physicochemical properties, with its role settled up in emulsification, aeration, bonding and stabilization. The avoiding of pathogenic microorganisms as well as the residual contamination of aflatoxin should be performed through rigorous quality control in whole production chain. Egg samples from two farms in the Northern Paraná state, Brazil were evaluated by competitive indirect enzyme immunoassay (IC-ELISA) developed with anti-aflatoxin B₁ monoclonal antibody (MAb), which was previously produced by AF.4 hybridoma strain. The MAb was diluted at 1: 30,000 for use in ic-ELISA, and aflatoxin contamination was analyzed in 300 randomly collected egg samples (n = 200 in farm A, and n = 100 farm B). The intra-laboratory validation showed adequate linearity ($R^2 = 0.9922$), with detection (LOD) and quantification (LOQ) limits of 0.38 µg/Kg and 0.71 µg/Kg, respectively. The developed assay also showed low matrix interference (3.41%), with average recovery rates of 95.5; 101.0 and 99.2% concerning the spiked contamination levels of 1.0; 2.0 and 5.0 ng/g (CV of 12.0, 1.2 and 5.1%), respectively. The accuracy, evaluated by repeatability (CV = 12.0%) and intermediate precision (CV = 14.8%), which are within the values recommended by Brazilian guideline ANVISA of the Ministry of Health. Taking to account the egg samples in farm A, 7.5% showed aflatoxin level > LOQ, which ranged from 0.72 to 1.12 µg /Kg. The contamination in farm B ranged from 0.71 to 1.29 µg /Kg, with 14% showing >LOQ. Regarding the quality profile of the egg, the mean whole egg mass was 56.24 g ± 3.33 and 58.85 g ± 3.40 in farm A and B, respectively; yolk mass was 16.72 g ± 1.41 in farm A, and 17.85 g ± 1.42 in farm B; clear mass was 33.68 g ± 2.35 in farm A, and 34.98 g ± 2.93 in farm B. Concerning the bark, which showed macroscopically normal feature, the percentage in egg in farm A and farm B corresponded to 10.40% ± 0.86 and 0.370 mm ± 0.04, respectively; the bark thickness values were 10.24% ± 0.71 and 0.373 mm ± 0.04, respectively. The developed ic-ELISA consisted in a rapid, simple and low cost screening tool, which should be a promising method for detecting AF in egg.

Key words: Egg. Aflatoxin B₁. IC-ELISA. Rapid method. Screening.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Produção de ovo com destaque aos Municípios produtores – 2015.	18
Figura 2. Estrutura do ovo.	19
Figura 3. Estrutura química de principais análogos de aflatoxina.	26
Figura 4. Biossíntese de aflatoxina.	28
Figura 5. Biotransformação de aflatoxina B ₁	29
Figura 6. Fluxograma geral do experimento.	42
Figura 8. Galpão de galinha poedeira, Arapongas - PR.	44
Figura 9. Sistema automatizado de coleta de ovo, silo de ração e sistema de gotejamento de água na granja A, Arapongas - PR.	44
Figura 7. Padronização ic-ELISA: curva de calibração e interferência da matriz (especificidade).	47
Figura 10. Validação intralaboratorial de ic-ELISA para análise de AFB ₁ em ovo.	49
Figura 11. Diluição de matriz visando redução da interferência para determinação de AFB ₁ por ic-ELISA em ovo.	54
Figura 12. Análise de desvios entre curva padrão e matrizada para determinação de AFB ₁ em ovo.	54
Figura 13. Curva padrão para detecção de AFB ₁ por ic-ELISA.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais aplicações de ovo industrializado.	17
Tabela 2. Composição de lipoproteínas em gema de ovo.	21
Tabela 3. Característica físico-química de principais análogos de aflatoxina.	26
Tabela 4. Ocorrência de AFB ₁ em milho e ração destinado para ave.	34
Tabela 5. Dados de granjas.	43
Tabela 6. Formulação de ração utilizada na granja.	43
Tabela 7. Parâmetros gerais de qualidade das amostras de ovo analisadas.	52
Tabela 8. Recuperação de AFB ₁ em amostras de ovo por ic-ELISA.	55
Tabela 9. Análise de precisão na determinação de AFB ₁ em ovo por ic-ELISA.	55
Tabela 10. Ocorrência e faixa de contaminação de aflatoxina B ₁ detectada em amostras de ovo por ic-ELISA.	57
Tabela 11. Taxa de transmissão de AFB ₁ da ração para o ovo.	58
Tabela 12. Parâmetros de qualidade e segurança em amostras de ovo que apresentaram valores de contaminação por AFB ₁ superior a 0,38 ug/Kg da granja A.	59
Tabela 13. Parâmetros de qualidade e segurança em amostras de ovo que apresentaram valores de contaminação por AFB ₁ superior a 0,38 ug/Kg da granja B.	60
Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A.	74
Tabela 15. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja B.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac: Anticorpo

AcM: Anticorpo Monoclonal

AF: Aflatoxina

AFB₁: Aflatoxina B₁

AFB₂: Aflatoxina B₂

AFG₁: Aflatoxina G₁

AFG₂: Aflatoxina G₂

AFQ₁: Aflatoxina Q₁

AFM₁: Aflatoxina M₁

AFP₁: Aflatoxina P₁

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists International*

BSA: *Bovine Serum Albumine* – Albumina de soro bovino

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV: Coeficiente de Variação

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

DP: Desvio Padrão

EC: *Europe Commission*

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HRP: *Horseradish peroxidase*

H-SFM: *Hybridoma-Serum free medium*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

ic-ELISA: *Indirect Competitive Enzyme Linked Immuno Assay*

IgG: Imunoglobulina G

LD: Limite de detecção

LMT: Limite Máximo Tolerado

LQ: Limite de quantificação

MS: Ministério da Saúde

NaCl: Cloreto de Sódio

OVA: Ovoalbumina

PBS: Tampão fosfato de sódio

PBST: Tampão fosfato de sódio-Tween

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Dodecil sulfato de sódio-Gel de Poliacrilamida

TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO.....	17
	3.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO OVO	19
	Casca	20
	Clara.....	20
	Gema.....	21
	2.3 QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE OVO	22
	2.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E CONTAMINANTE RESIDUAIS - MICOTOXINAS.....	22
	2.5 AFLATOXINAS.....	24
	Fungos micotoxigênicos	24
	Características físico- químicas de aflatoxina	25
	Biossíntese	27
	Mecanismo de ação	28
	Toxicidade	30
	de aflatoxina	30
	Ocorrência em alimento – perigo à cadeia produtiva de ovo em agronegócio.....	32
	Metodologia analítica na determinação de aflatoxina.....	37
3.	OBJETIVOS	40
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
	4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	41
	4.2 DADOS DE GRANJA	43
	4.3 AMOSTRAGEM.....	45
	4.4 PARÂMETROS AVALIADOS PARA A QUALIDADE DE OVO.....	45
	4.4.1 Determinação do peso médio de ovo.....	45
	4.4.2 Componentes de ovo.....	45
	4.4.3 Espessura da casca.....	45
	4.5 QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS	46
	4.5.1 Extração de aflatoxinas	46
	4.5.2 Elisa competitivo indireto.....	46
	Procedimento.....	47
	4.6 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE ic-ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AFB ₁	48
	4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
	5.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE.....	51
	5.2 AFLATOXINA EM OVO.....	52
	5.2.1 Validação intralaboratorial de ic-ELISA.....	52
	5.2 AFLATOXINA EM OVO.....	56
5	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO	74

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de ovos atingiu 3,82 bilhões de dúzias em 2016, sendo que 54,8% das granjas produziram visando consumo, principalmente para fins alimentícios e, correspondem a 78,7% da produção, enquanto 45,2% destinaram-se à incubação. O Estado do Paraná manteve como terceiro produtor de ovo do país, atrás apenas do Estado de São Paulo e Minas Gerais.

O alto valor nutricional de ovo decorre da composição rica em vitaminas, minerais, ácidos graxos e proteínas - aminoácidos essenciais, tornando-o num dos alimentos mais completos à dieta humana, aliado ao custo acessível à população de baixa renda.

O aumento no consumo de ovo com máximo aproveitamento de propriedade nutricional depende da qualidade final, determinada por conjunto de fatores que influenciam aceitabilidade no mercado. O armazenamento altera a característica físico-química como propriedade funcional de proteína, sendo este dependente de tempo, temperatura e umidade relativa do ar. A qualidade microbiológica é outro fator relevante, já que determinados patógenos migram de ave para ovo na postura, ou adentram a barreira de casca durante armazenamento.

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por diversos gêneros fúngicos em cereais e derivados, comumente destinados à formulação de ração; o interesse primordial na avicultura industrial se deve ao impacto no desempenho produtivo e reprodutivo, sendo a contaminação residual detectada em carne e ovo. Aflatoxinas são potentes micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* com ênfase a *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, cuja produção depende da combinação de fatores, seja espécimen fúngica, assim como fatores extrínsecos – temperatura & umidade do grão e, estresse em ave.

Embora a legislação brasileira não determine o limite para aflatoxina em ovo, o controle em nível comercial deve ser importante, considerando não somente os possíveis prejuízos causados em ave, mas também pela repercussão à qualidade de inúmeros alimentos derivados e, conseqüentemente à saúde de consumidor humano.

O monitoramento de micotoxinas em produtos de origem animal requer métodos analíticos capazes de detectar níveis de toxina reduzidos ao fator de centenas a milhares de vezes, em relação ao teor presente em produtos de origem vegetal destinado à formulação de ração. Estes métodos sensíveis, específicos, confiáveis, precisos e robustos também devem contemplar requisitos perante uso fácil, rápido e, principalmente econômico, visando disseminação ao setor produtivo.

O método imunoenzimático ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* para quantificação de aflatoxinas tem sido alternativa acessível ao setor agroindustrial. A técnica tem sido método rápido ideal para a triagem de amostras, mas com possibilidade de fornecer dados quantitativos, se devidamente validados. O princípio analítico é baseado em imun química, cuja sensibilidade e especificidade dependem da ligação de antígeno-Ag com o respectivo anticorpo-Ac, correspondente a características estruturais das regiões hipervariáveis do Ac. Considerando que um linfócito B produz um Ac – imunoglobulina-Ig de única especificidade contra infinitas possibilidades apresentadas pelo epítipo do Ag, o clone de hibridoma, capaz de produzir melhor anticorpo monoclonal-AcM, i.e, elevada especificidade e sensibilidade, define a qualidade de produto biotecnológico gerado para aplicação em pesquisa e diagnóstico.

O trabalho tem como objetivo desenvolver e implementar o ensaio ic-ELISA empregando AcM anti-aflatoxina produzido pelo hibridoma AF4; a seguir, aplicar a metodologia padronizada para avaliar a ocorrência de aflatoxinas em ovos provenientes de duas granjas selecionadas para o estudo, tendo como diferencial o sistema de coleta e classificação, em Região Norte do Estado de Paraná, Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO

A produção de ovo brasileiro em expansão atingiu 3,82 bilhões de dúzias e rendeu R\$ 11,46 bilhões em 2016. Considerando a finalidade de granja com capacidade de pelo menos 10.000 galinhas poedeiras e, dividindo-se em categoria conforme produção para o consumo e incubação, 54,8% produziu ovo para consumo, respondendo por 78,7% do total produzido, enquanto 45,2% destinaram-se à incubação (obtenção de pintainhas, ovo embrionado para produção de vacinas, entre outros), respondendo por 21,3% da produção (IBGE, 2017).

Na categoria de produção para o consumo, salienta-se que ovos que se enquadrem nas especificações referentes a coloração da casca, qualidade e peso determinadas pela legislação (BRASIL, 1990) destinam-se para o consumo direto, enquanto que produto com peso inferior a 45g ou trincado só poderá ser comercializado para a indústria de processamento (onde será transformado em ovo em pó, liofilizado ou líquido pasteurizado) caso não haja rompimento da membrana, apresentando gema intacta e não aderente à casca. As principais aplicações de ovos industrializados estão dispostas na Tabela 1 (AMARAL et al., 2016). Ovo considerado não comestível deverá ser disposto em recipiente devidamente identificado e poderá ser utilizado para fabricação de ração animal. Incluem-se nesta categoria: ovo com matéria estranha visível, desde que não seja mancha de sangue e carne removível; com parte da casca e membrana da casca faltando, e com manchas de carne aderidas; com sujeira ou matéria estranha aderida à casca; com rachaduras na membrana e na casca; ovo líquido recuperado de recipientes de ovos em casca ou recipientes de quebra imediata junta a lavagem de ovos; ovo com vazamento ocorrido na operação de lavagem e ovo com indicação de que o conteúdo está exsudando ou já exsudou antes de sua remoção da embalagem (BRASIL, 1990).

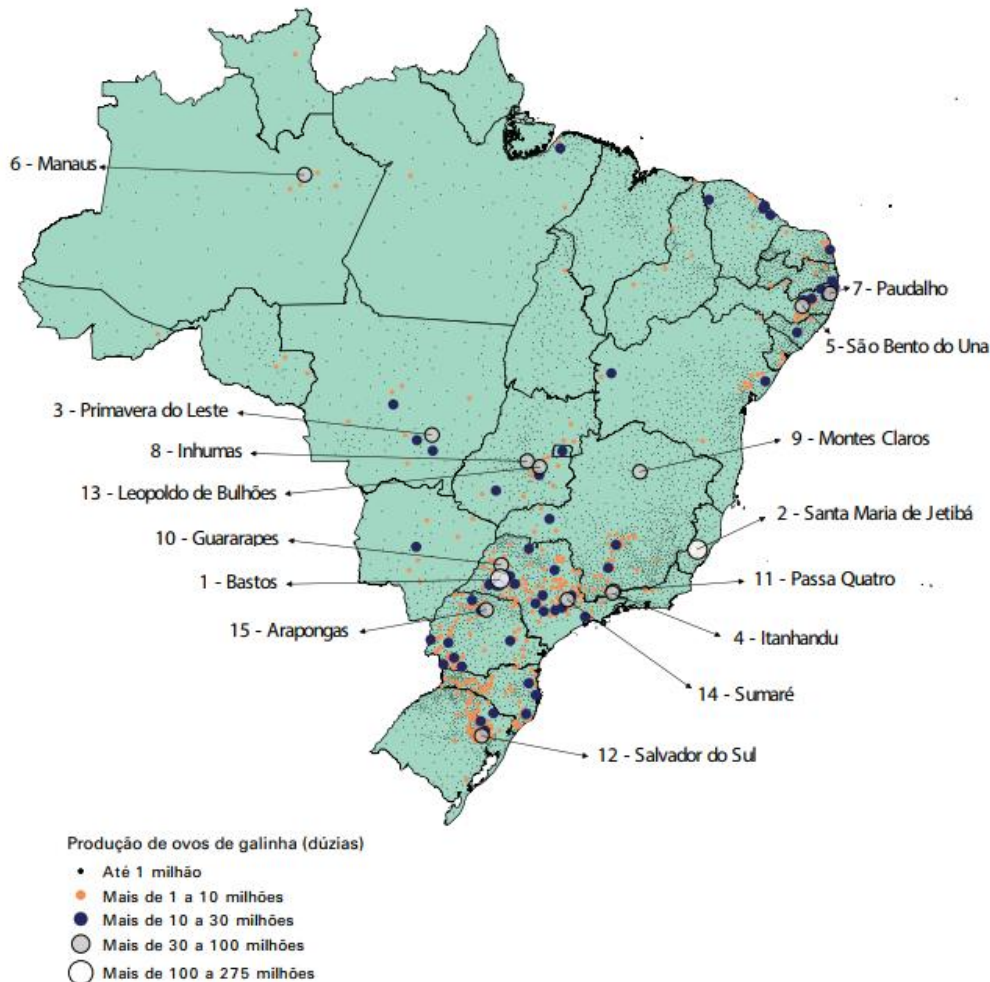
Tabela 1. Principais aplicações de ovo industrializado.

TIPO DE OVOPRODUTO	INTEIRO	GEMA	CLARA
Pastelaria e curtidos		*	*
Panificação, pastas alimentícias, pratos preparados, <i>pet food</i> , alimentos para aquicultura	*	*	
Produtos lácteos, sorvetes, bebidas, alimentos infantis, cremes e sopas, maioneses e molhos, adesivos e colas	*	*	*
Produtos cosméticos e indústria farmacêutica		*	

FONTE: Amaral et al., 2016.

O aumento no consumo interno de 190 ovos por indivíduo em 2016 provavelmente decorreu da redução no poder aquisitivo da população, optando-se por fontes proteicas de menor custo (ABPA, 2017; IBGE, 2017).

Figura 1. Produção de ovo com destaque aos Municípios produtores – 2015.



FONTE: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal (2015).

O Estado do Paraná manteve-se em terceiro produtor de ovo do país (9,1 %), atrás do Estado de São Paulo (29,8 %) e Minas Gerais (9,6 %). A Região Sudeste produziu 43,5 % de ovos, seguida pela Região Sul com 24,3 %; Nordeste com 16,8 %; Centro-Oeste com 11,8 % e Norte com 3,6 % da produção nacional, sendo os Municípios destaques representados na Figura 1. Os dados promissores indicaram um aumento de 7,3 % no segundo trimestre de 2017, se comparado ao mesmo período de ano anterior (IBGE, 2017). A produção de ovos no Paraná de 360.599 mil dúzias em 2015 teve a contribuição da Região

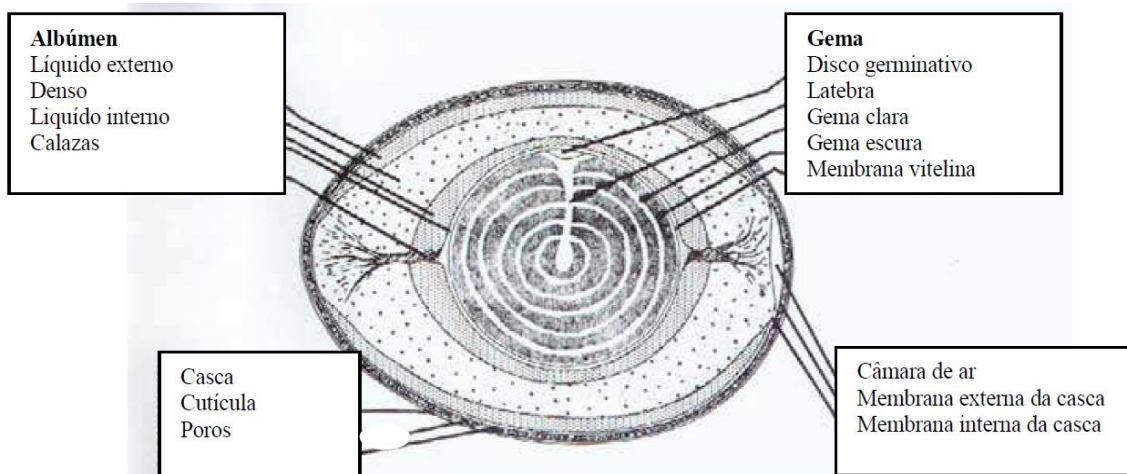
Norte com 86.677 mil dúzias, com destaque ao município de Arapongas com maior produção do Estado (Figura 1) (IBGE, 2015).

2.2 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DO OVO

Conforme portaria n° 1 de 21 de fevereiro de 1990 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, a designação ‘ovo’ refere-se ao ovo de galinha em casca, sendo os demais acompanhados pelo nome da espécie de origem (BRASIL, 1990).

Tendo formato esférico-ovalado com peso entre 35 a 80 g, as principais partes de um ovo consistem de gema com disco germinativo, membrana vitelina (27,5%), clara (albúmen, 63%), membrana da casca e casca (9,5%), enquanto calaza, câmara de ar e cutícula constituem a parte menor, conforme figura 2 (LANA, 2000; ALLEONI, 2001; ALCÂNTARA, 2012).

Figura 2. Estrutura do ovo.



FONTE: USDA, adaptado por LANA (2000).

Os componentes básicos de ovo são: água, proteína, gordura, carboidrato, minerais e vitaminas, sendo que um ovo grande contribui com 74 Kcal, 6 g de proteína, 4,5 g de gorduras totais e 212 mg de colesterol (ALCÂNTARA, 2012). Este alimento multifuncional é de extrema importância à indústria, devido à propriedade coagulante, espumante, adesiva e emulsificante (CARVALHO, 2012).

Casca

A casca afunilada é embalagem natural de ovo, composta por carbonato de cálcio recoberto por matriz orgânica de fibra proteica e complexo proteína-mucopolissacarídeo com 7.000 a 17.000 micro poros.

A membrana da casca é composta por duas camadas, a “esponjosa” (membrana externa com 48 μm de espessura), e “mamilária” (interna com 22 μm), sendo ambas constituídas de fibras proteicas inter cruzadas, cuja estrutura confere resistência à casca, permeabilidade a gases e restringe a penetração microbiana (FENNEMA, 1976; ALLEONI, 2001; BENITES et al., 2005; RAMOS, 2008; MEDEIROS e ALVES, 2014). A câmara de ar na extremidade maior do diâmetro do ovo é o espaço entre as membranas interna e externa da casca. Na postura, o resfriamento de temperatura corporal de ave à temperatura ambiente desencadeia contração de membrana interna e, o vácuo resultante favorece a entrada de ar na câmara (ALLEONI, 2001; BENITES et al., 2005).

Clara

A clara constituída de água, proteínas e minerais é elástica e viscosa, com glucose livre como fonte energética primária disponível ao embrião. Entre as principais proteínas, a ovalbumina, conalbumina, ovomucóide, ovomucina e lisozima, as duas primeiras representam 70% do total proteico da clara, responsáveis pela gelatinização do albúmen (RAMOS, 2008).

A clara apresenta quatro camadas distintas, diferenciadas pela viscosidade, determinada por teor de ovomucina: camada externa (estreita e fluida), intermediária (espessa e densa), interna (fluida e fina) e calazífera. A proporção de camada varia em função de raça, condição ambiental, tamanho de ovo e ritmo de produção (LINDEN e LORIENT, 1999; BENITES et al., 2005; REGO et al., 2012). A camada calazífera envolve a gema e se ramifica em duas calazas, constituída por fibra de mucina, ligando a gema à casca; i.e., estende como albúmen espesso em pontos opostos da gema (LARRAÑAGA et al., 1999). A calaza adere à membrana vitelina da gema até a câmara de ar e, do outro lado até a ponta mais fina de ovo, centralizando a gema (BENITES et al., 2005).

Gema

A gema é uma emulsão de gordura em água, contendo um terço de proteínas e dois terços de lipídeos e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), glicose, lecitina e sais minerais (CLOSA, 1999). A riqueza em pigmentos se deve a riboflavina, xantofilas e β -caroteno, cuja composição varia com a dieta (REGESTEIN e REGESTEIN, 1984; MACRAE et al., 1993; NA et al., 2004).

As lipoproteínas são as principais responsáveis pela propriedade emulsionante da gema (Tabela 2), sendo fracionadas em dois por centrifugação: o sedimento denominado de grânulo e o sobrenadante de plasma. O grânulo (lipoproteína de alta densidade - HDL) é representado por α e β - lipovitelinina e fosvitina com diâmetro de 0,3 - 1,6 μ m (FENEMA, 1976). O plasma (lipoproteína de baixa densidade - LDL) é constituído de lipovitelinina, livetinas e proteína ligada à riboflavina (flavina ou vitamina B₂), com diâmetro entre 20-150 μ m (RAMOS, 2008).

Tabela 2. Composição de lipoproteínas em gema de ovo.

	Matéria Seca (%)	Proteínas (%)	Massa Molecular (Da)	Conteúdo Lipídico (%)	Fosfato (%)	Localização
Lipovitelinina (HDL)	16	36	400 000	20	$\alpha= 0,5$ $\beta= 0,25$	Grânulo
Fosvitina	4	10	36 000	0	10	Grânulo
Lipovitelinina (HDL)	68	24	$3,10 \times 10^6$	88	0,1	Plasma
Livetinas	10	30	$\alpha= 80 000$ $\beta= 45 000$ $\gamma= 150 000$	0	-	Plasma
Proteína ligada à riboflavina (YRBP)	1,5	0,4	36 000	0	0,2	Plasma

Fonte: LINDEN e LORIENT, 1999.

Os lipídeos compreendem de 31,8 a 35,5% da gema, sendo trigliceróis, fosfolípidos, colesterol e outros em menor quantidade (DAVIS e REEVES, 2002; TERNES, 2003).

2.3 QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE OVO

A qualidade de ovo depende de fatores extrínsecos e intrínsecos, sendo o primeiro relacionado à qualidade de casca, estrutura e higiene; o segundo considera a cor, odor, sabor, mancha de sangue, câmara de ar, gema e albúmen (MENDES, 2010).

A coloração da casca é determinada pela herança genética da poedeira, regida por genes reguladores da deposição de pigmento como porfirina, através de glândulas calcíferas presente no útero. As poedeiras brancas depositam pouca porfirina na parte interna da casca, enquanto as produtoras de ovo vermelho ou marrom depositam maior quantidade deste pigmento na região externa da casca (BENITES et al., 2005).

A legislação brasileira classifica os ovos destinados ao comércio interno ou externo em grupo, classe e tipo, considerando coloração da casca, qualidade e peso (XAVIER et al., 2008). O ovo é classificado em seis tipos conforme peso: jumbo (mínimo de 66g/unidade), extra (60 a 65g/unidade), grande (55 a 59g/unidade), médio (50 a 54g/unidade), pequeno (45 a 49g/unidade) e industrial (>45g), sendo também destinados à industrialização, os quebrados/trincados (BRASIL, 2003). O albúmen deve ser límpido, transparente, homogêneo e viscoso formando gel, com uma porção fluida circundando a clara espessa e gema. A camada amarela clara e escura se alterna em gema. O pH da clara e gema é aproximadamente 7,9 e 6,2, respectivamente (SEIBEL, 2005).

Conforme qualidade, os ovos são agrupados em classes A, B, C, sujo, trincado e partido. O ovo trincado apresenta a casca quebrada ou com fendas, mas com membrana intacta e sem extravase de conteúdo. Ovos partidos apresenta a casca quebrada com rompimento de membrana com ou sem extravase de conteúdo (BRASIL, 1997).

2.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E CONTAMINANTE RESIDUAIS - MICOTOXINAS

A contaminação microbiana em alimentos é um problema de saúde pública. Os cuidados e a qualidade de matéria-prima, processamento e armazenamento (da indústria ao mercado) são os parâmetros importantes na minimização do perigo de toxinfecção alimentar (RIBEIRO et al., 2007).

A indústria avícola brasileira está em constante expansão, se tornando cada vez mais representativa na produção e exportação de seus produtos. Um fator que tem contribuído para este crescimento é a adoção das boas práticas de fabricação. Estas medidas visam a

diminuição de patógenos que afetam o peso, qualidade da carne e de ovos e podem provocar grandes prejuízos à produção avícola. As doenças que acometem essas aves têm as mais variadas origens e agentes causadores como bactérias, fungos, vírus e parasitas. As doenças mais comuns causadas por bactérias são a salmonelose, causada por bactérias do gênero *Salmonella*; colibacilose aviária, micoplasmose, coriza infecciosa, cólera aviária, botulismo, estafilococose e estreptococose causados por *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp., respectivamente. Micotoxicoses são as principais doenças relacionadas a contaminação fúngica. Entre as viroses estão a doença de Gumboro, doença de Newcastle, bronquite infecciosa, influenza aviária, boubá aviária, doença de Marek, leucose linfóide e encefalomielite aviária. Verminoses, ectoparasitoses e coccidiose são as principais doenças causadas por parasitas (TESSARI; CARDOSO 2012).

Bactérias constituem os principais responsáveis pela alteração físico-química em ovo pós-postura, com ênfase a gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Flavobacterium* entre os predominantes na deterioração (GAMA, 2001). Surtos de salmonelose humana são comumente associados a *Salmonella enterica*, tendo como principais veículos de transmissão os produtos de origem aviária, como ovos e carnes de frango. Kottwitz et al. (2008) analisaram amostras de material biológico de aves e de ovos destinados ao consumo humano. As amostras foram coletadas entre abril e agosto de 2004 em um cooperativa com integração de postura comercial do estado do Paraná. Foram analisadas 60 amostras de fezes, 3000 suabes de cloaca e 3000 ovos. *Salmonella* foi isolada em 8 das 30 granjas analisadas. Foi realizada a coleta de ovos nas granjas houve isolamento de *Salmonella* spp. e as amostras não apresentaram contaminação por *Salmonella*.

Kottwitz et al. (2013) descreveram a ocorrência de diferentes sorovares de *Salmonella entérica* e fagótipos de *S. enterica* sorovar Enteritidis em ovos destinados ao consumo humano. Os autores analisaram quatro mil ovos obtidos de granjas comerciais e mil ovos de incubação descartados de granjas de frango de corte. *Salmonella* spp. não foi isolada de ovos obtidos em granjas comerciais, mas foi isolada em cerca de 52,0 % dos ovos de incubação descartados, em que o sorovar predominante foi Enteritidis correspondendo a 84,6 %.

Fungos micotoxigênicos podem desempenhar importante papel na deterioração de produtos alimentícios. Outrossim, o problema maior decorre da síntese de metabólitos secundários de elevada toxidez, as micotoxinas. *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e

Penicillium spp. merecem atenção especial pela frequência na cadeia alimentícia desde a contaminação no campo, colheita, pós colheita e armazenamento (GOTO et al., 1996; KLICH et al., 2000). A ocorrência de micotoxinas em produtos de origem animal normalmente decorre de contaminação indireta pela ingestão de matérias-primas vegetais contaminadas. A estabilidade estrutural, aliada à lipossolubilidade molecular desencadeia contaminação sequencial em níveis residuais em tecidos e fluídos corporais, seja carne, leite, ovo e todos os produtos alimentares derivados (KLICH, 2007).

Seis grupos compõem as principais micotoxinas contaminantes em alimentos: aflatoxina, fumonisina, ocratoxina, patulina, tricoteceno e zearalenona (KLICH, 2007).

O gênero *Aspergillus* ocorre comumente no solo sob plantio de milho, amendoim, semente de algodão e nozes. Em condições inadequadas de colheita e armazenamento, o fungo aflatoxigênico é capaz de crescer e produzir os diferentes análogos de aflatoxina, causando impacto negativo à avicultura industrial, já que o milho é o principal constituinte da ração. O nível produzido é determinado principalmente pela microbiota – combinação / interação de espécies fúngicas em substrato – composição de grão e respectivos cultivares, temperatura, umidade, sistema de plantio, entre outros. Esta micotoxina afeta diretamente o desempenho produtivo e reprodutivo de ave, compromete o sistema imunológico, sendo o fator estresse também determinante no grau de prejuízo causado. O perigo a humano decorre da possibilidade de permanência de resíduos tóxicos em carne e ovo (SANTÚRIO, 2000; SILOTO, 2010; BOEMO, 2015).

2.5 AFLATOXINAS

Fungos micotoxigênicos

As aflatoxinas são produzidas principalmente pelo gênero *Aspergillus* pertencentes às espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* (predominantemente nos países tropicais), assim como *A. niger*, *A. oryzae*, *A. wentii*, *A. fumigatus* e *A. frenesii*. Espécies produtores em menor frequência são: *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* e *A. pseudotamari*. Entre o gênero *Penicillium* citam-se *P. puberulum*, *P. citrinum*, *P. variable* e *P. frequentans* (GOTO et al., 1996; SCUSSEL, 1998; PETERSON et al., 2001).

A. flavus produz aflatoxinas B₁ e B₂ e, a colônia verde-amarelada apresenta crescimento rápido com 65-70 mm de diâmetro após 7 dias a 25°C, sendo ótima a 33°C, pH

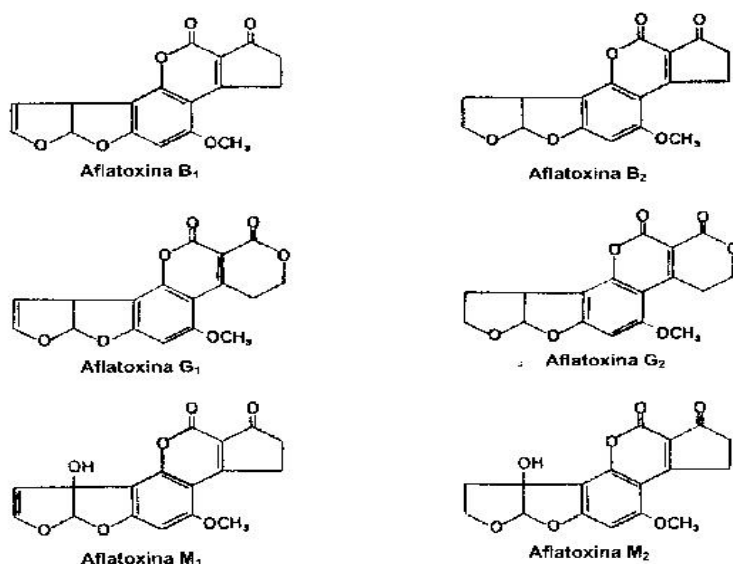
entre 3,4-10 e atividade de água mínima de 0,78 (KLICH, 2007; PITT e HOCKING, 2009). Embora a forma filamentosa predomine, em condição adversa como seca e escassez de nutrientes produz estrutura de resistência denominada de escleródios (YU et al., 2005).

Características físico- químicas de aflatoxina

A descoberta de aflatoxina ocorreu na Inglaterra no início da década de 60, desencadeando doença de etiologia desconhecida com elevada mortalidade em perus e outras aves, pós-ingestão de torta de amendoim contaminado. Denominada de “*Turkey X Disease*”, os sintomas típicos caracterizavam-se pelo ingurgitamento e congestão renal, hemorragia ou necrose de fígado e, desapareceram pela mudança de ração (COULOMBE, 1991). O problema estava relacionado com a ingestão de ração com farelo de amendoim de origem brasileira apresentando muita hifa, identificada como *A. parasiticus* (SANTURIO, 2000; DORNER, 2008; MARIN et al., 2013).

O nome aflatoxina deriva da primeira letra *Aspergillus* e das três primeiras letras de *flavus*. Dentre os produtores de aflatoxinas, *A. flavus* e *A. pseudotamarii* sintetizam as aflatoxinas B₁ e B₂, enquanto que *A. parasiticus* e *A. nomius* sintetizam AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (CHO et al., 2008). *A. flavus* também sintetiza o ácido ciclopiazônico, ác. kójico, ác. β- nitropropiónico, aspertoxina, aflatrem e ác. aspergílico (YU et al., 2005).

Aflatoxinas constituem um grupo com mais de 20 análogos bisfuranos, sendo os principais denominados de B₁, B₂, G₁ e G₂ (COULOMBE, 1991; HUSSEIN; BRASEL, 2001). A figura 2 apresenta a estrutura molecular de quatro análogos de aflatoxina de ocorrência natural (B₁, B₂, G₁ e G₂) e, dois bioprodutos (M₁ e M₂) oriundos de metabolismo hepático e excretado no leite de mamíferos sob alimentação contaminada.

Figura 3. Estrutura química de principais análogos de aflatoxina.

Fonte: COULOMBE, 1991.

Aflatoxina purificada é composto incolor, inodora de natureza cristalina, cuja baixa massa molecular confere termoestabilidade à temperatura aproximada de 200°C, não sendo afetada pelo frio (Tabela 3). A toxina é solúvel em solventes polares (clorofórmio e metanol), mas insolúvel em gordura e óleo; relativamente instáveis à luz, particularmente à radiação ultravioleta, assim como é destruída sob hipoclorito ou soluções fortemente alcalinas como a amônia e o hipoclorito (OPAS, 1983).

Tabela 3. Característica físico-química de principais análogos de aflatoxina.

Aflatoxina	Fórmula química	Massa molecular	Temperatura de fusão (°C)	Emissão de fluorescência (nm e cor*)
AFB₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	269	425 – azul
AFB₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	425 – azul
AFG₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	450 – verde
AFG₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	450 – verde
AFM₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	425 – violeta azulada
AFM₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	293	425 – violeta
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234	425

*Sob luz ultravioleta.

Fonte: OPAS (1983).

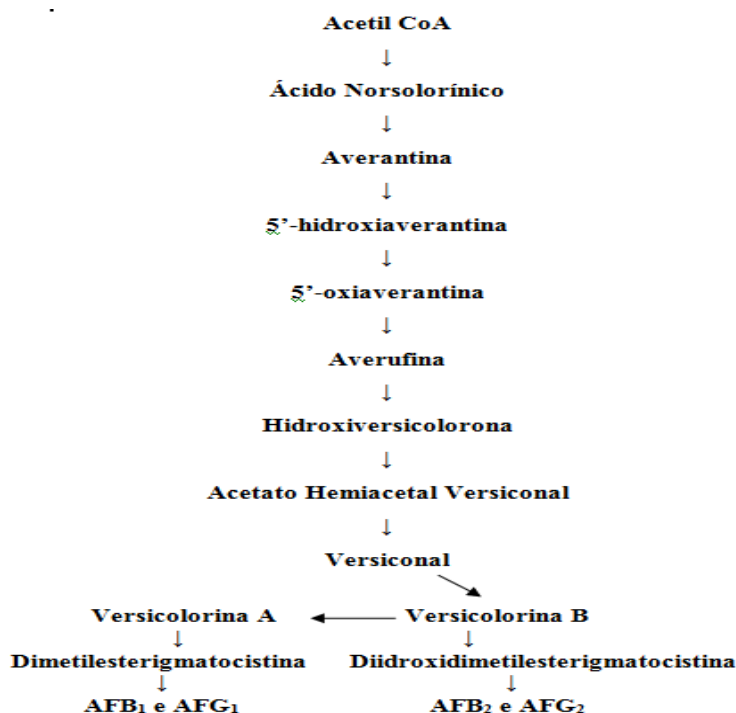
A eliminação de AFL ocorre primeiramente pela secreção biliar (~58%), seguida de urina (~35%) e, uma fração considerável eliminada no leite como AFM₁ em lactentes e animais em lactação (MCLEAN e DUTTON, 1995).

A decomposição de AFL ocorre na faixa de temperatura entre 237-306°C, variando com a atividade de água, pH do substrato e tempo de exposição ao calor. Por outro lado, os raios ultravioleta da luz do sol são eficazes na desativação de AFL. Não há um método totalmente eficaz para a inativação das AFL, sendo que eficiência de cada processo depende do tipo de alimento a ser descontaminado, respectiva atividade de água, análogos de AFL presentes, o nível de contaminação e o grau de associação entre AFL com os constituintes do alimento, principalmente às proteínas (RUSTOM, 1997; RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

Biossíntese

Esta bis-furano-cumarina deriva de decacetídeo - via de policetidas (policetida sintase), cuja unidade C₂ é perdida durante a formação de anel bisfurano; apresenta anéis diidrofurano (AFB₁ e AFG₁) ou tetraidrofurano (AFB₂ e AFG₂) ligados a uma cumarina substituída. AFB apresenta anel ciclopentanona, enquanto a série G apresenta anel lactona. Os análogos AFB₂ e AFG₂ são dihidroderivados de B₁ e G₁, respectivamente e, classificadas conforme fluorescência: B₁ e B₂ em azul (“*blue*”, 425nm) e, G₁ e G₂ em verde (“*green*”, 540nm). AFM₁ e AFM₂ ocorrem no leite -“*milk*” (LEESON et al., 1995; MARAGOS et al., 2008; RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010).

A biossíntese inicia com a conversão de acetato e malonil CoA à unidade hexanoil iniciadora pela ação de uma ácido graxo sintase (Figura 3). O tamanho da molécula é estendido pela ação de policetida sintase, originando o ácido norsolorínico decacetida, o primeiro policetídeo precursor estável de aflatoxina. As reações enzimáticas sequenciais e subsequentes consistem de 12 a 17 biotransformações, originando uma série de intermediários, como: averantina, 5'-hidroxiaverantina, 5'-oxiaverantina, averufina, hidroxiversicolorona, acetato hemiacetal versiconal, versiconal e versicolorina B. Posteriormente, a via divide-se originando as AFB₁ e AFG₁ a partir da dimetilesterigmatocistina e, AFB₂ e AFG₂ a partir da dihidroxidimetilesterigmatocistina, assim como outros inúmeros análogos estruturalmente semelhantes (SWEENEY e DOBSON, 1998; CRAWFORD et al., 2009; SHIMA et al., 2009).

Figura 4. Biossíntese de aflatoxina.

Fonte: adaptado por SHIMA et al. (2009).

A condição ótima para síntese de aflatoxina por *A. flavus* é 35 °C e aw 0,95, enquanto para *A. parasiticus* é de 33 °C e aw 0,99, não sendo sintetizada em < 7,5 °C, ou > 40 °C (BARKAI-GOLAN, 2008). Em milho, altas temperaturas e estresse hídrico contribuem para o aumento nos níveis de contaminação (CAST, 2003).

Mecanismo de ação

Embora apresentem estrutura química e física semelhantes, as aflatoxinas diferem no grau de atividade biológica. AFB₁, a mais frequente, apresenta maior toxigenicidade, sendo o análogo produzido em maior quantidade pelas cepas toxigênicas. A toxicidade de AFB₂, AFG₁ e AFG₂ é cerca de 50, 20 e 10% de AFB₁, respectivamente (BUSBY; WOGAN, 1981; SQUIRE, 1981; LESSON et al., 1995; LI et al., 2009; CHO et al., 2008; DORNER, 2008).

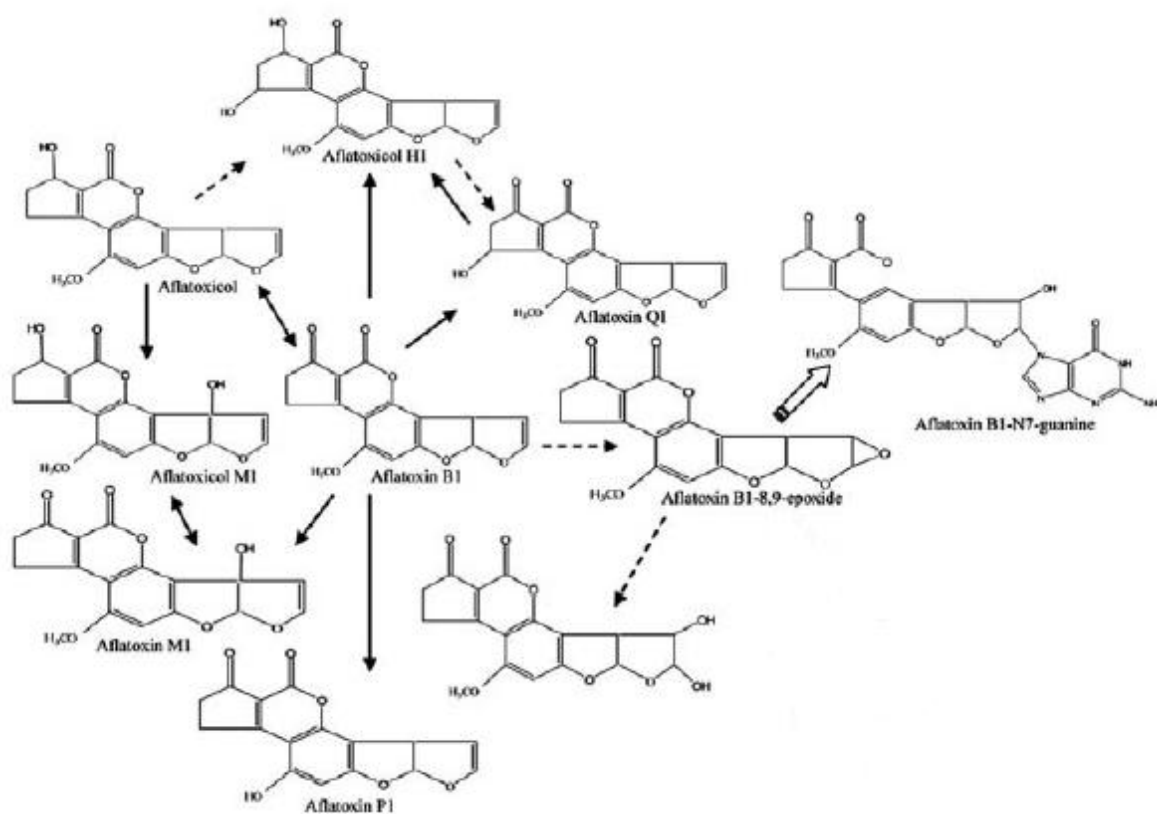
O fígado é o principal alvo de AFB₁, cuja lesão primária inclui necrose hemorrágica, infiltração de ácidos graxos e proliferação de dutos biliares, enquanto em pato e rato a região periportal é o principal sítio de ação da toxina (DORNER, 2008).

A biotransformação primária no fígado ocorre por enzimas microsossomais do sistema oxidase de função mista (BIEHL e BUCK, 1987; WYATT, 1991; RAMOS e

HERNANDEZ, 1996). Outrossim, a biotransformação de aflatoxina pós-depositada no fígado pelo sistema microsossomal hepático resulta em metabólito de alta toxidez, o epóxido reativo capaz de ligar covalentemente aos constituintes intracelulares, incluindo DNA e RNA.

O efeito tóxico/cancerígeno de AFB₁ manifesta pós-metabolismo hepático pela monoxigenase citocromo P-450 dependente (CYP), cuja catálise oxidativa resulta em inúmeros derivados hidroxilados como AFM₁ (prevalente), AFQ₁ e AFP₁ de menor toxicidade, bem como gera AFB₁-8,9-epóxido (AFBO) altamente reativo (Figura 4).

Figura 5. Biotransformação de aflatoxina B₁.



As linhas cheias representam as vias conhecidas; as tracejadas, as vias hipotéticas.
 Fonte: Dói e Choi (2007) adaptado de Coulombe (1993).

O efeito carcinogênico e mutagênico de AFB₁ é atribuído à afinidade eletrofílica de AFBO ao DNA e proteínas, resultando em dois adutos macromoleculares principais, o AFB₁-N7-guanina com o DNA e AFB₁-lisina com a albumina de soro (COULOMBE, 1993; WANG et al., 1996; MARAGOS et al., 2008). O aducto AFB₁-N7-Gua pode causar uma mutação somática pontual no gene TP53, na terceira base do códon 249, acarretando uma transversão GC para TA. A mutação provoca a substituição de uma arginina por serina na proteína p53 com ação “supressora de tumor” (MENDY; WALTON, 2009). Se

o dano ao DNA for grave, os mecanismos dependentes de *p53* podem iniciar apoptose conduzindo, à morte celular. A mutação somática no gene TP53 está intimamente associada ao risco de desenvolver câncer de fígado, sugerindo que mecanismos dependentes de *p53* normalmente agem para preservar a integridade genômica (MENDY; WALTON, 2009). Adicionalmente, a AFB₁ pode atuar como alquilante de DNA formando sítios apurínicos pela perda de bases nitrogenadas, e, induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) promovedoras da oxidação de DNA (COULOMBE, 1993).

A ligação de AFB₁ – o epóxido com DNA modifica a estrutura e, conseqüente atividade biológica, originando o mecanismo básico de mutagênese e carcinogênese (SANTURIO, 1999). Além disso, no núcleo de hepatócito ocorre a inibição de RNA-polimerase e, subsequente síntese proteica (WYATT, 1991). A síntese hepática de gordura, bem como transporte para outras áreas do organismo também é seriamente afetada (MERKLEY et al., 1987).

A AFB₁ também pode ser reduzida ao aflatoxicol por enzimas citosólicas solúveis NADPH-dependentes, cuja reversibilidade da reação constitui estoque de AFB₁. Outros dois metabólitos relativamente atóxicos produzidos em menor quantidade são aflatoxicol M₁ e aflatoxicol H₁ (COULOMBE, 1993; WANG et al., 1996).

Toxicidade de aflatoxina

A aflatoxina apresenta uma vasta atividade biológica, com ênfase à teratogenicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade aguda. *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou AFB₁ como carcinógeno do grupo 1, i.e. carcinogênico para humano, sendo considerada carcinógeno natural mais potente conhecido (IARC, 2002).

A toxicidade de aflatoxina depende da dose e tempo de exposição, com maior susceptibilidade em macho e animal jovem (MCLEAN e DUTTON, 1995). Na mesma espécie, a relação dose-resposta varia com raça, sexo, idade, entre outros (COULOMBE, 1991). A absorção rápida e imediata após ingestão ocorre no trato gastrointestinal i.e., difusão passiva através de intestino, difundindo-se rapidamente para todo o organismo, cerca de três horas pós-alimentação. AFB₁ e AFB₂ podem ser detectados em todos os tecidos de ave, principalmente na moela e fígado (GARCIA et al., 2012; TESSARI; CARDOSO, 2012).

Sawhney et al. (1973) detectaram nível elevado de aflatoxina já em primeiro

dia de intoxicação no fígado, órgãos reprodutores e rins, responsáveis pela excreção de toxinas, mas detectadas nos excrementos apenas sete dias pós-ingestão.

A cor de fígado contaminado varia de normal a amarelo pálido, podendo ocorrer petéquias e extensa área hemorrágica, assim como infiltração gordurosa com grau dependente da dose e tempo de intoxicação, com o aumento no tamanho do órgão do frango de corte em até 68% (SANTURIO, 1999). Na indústria avícola, a ração contaminada causou redução de até 10% no peso, com doses inferiores a 75 µg de aflatoxina por quilo de ração (LAZZARI, 1997).

O efeito agudo é essencialmente observado na estrutura e funcionalidade hepática, incluindo necrose, hemorragia, lesão, fibrose e cirrose. Adicionalmente, encefalopatia, imunossupressão, infecção respiratória, hemorragia gastrointestinal, anorexia, mal-estar e febre têm sido observados. Na síndrome crônica com ingestão de baixa dose por longo período, o sinal mais evidente é redução na taxa de crescimento em animais jovens, ocorrendo também cancro de fígado, assim como carcinomas em rim, pulmão, colón e sistema nervoso. O efeito em frango é maior na fase inicial de criação, até os 21 dias de vida, mas o reflexo negativo no ganho de peso persiste até a fase final (HUFF et al., 1986; LEESON et al., 1995).

A coagulação sanguínea é retardada ou interrompida, provocando hemorragia. Tessari et al. (2005) demonstraram uma redução nos níveis séricos de proteínas totais após 20 dias de exposição contínua de 200 µg de AFB₁/kg em ração. O principal órgão lesado é o fígado, com série de dano ao metabolismo de proteína, carboidrato e lipídeo, com degeneração gordurosa e proliferação de ductos biliares induzindo alterações séricas, constatando principalmente o aumento na atividade enzimática, coagulopatia e diminuição na produção proteica (HOERR, 1997; OLIVEIRA e GERMANO, 1997). Intestino, baço, linfônodo e rim também podem sofrer alteração, principalmente em monogástricos como ave e suíno (MARIN, 2002).

A imunossupressão e, conseqüente diminuição da resistência à enfermidade, decorre de dano no sistema reticulo endotelial. Em frango de corte, o efeito repercute em baixa resposta vacinal e surgimento de doenças inespecíficas (MARIN, 2002). A imunossupressão induzida pela aflatoxina se manifesta pela depressão da atividade de linfócito T ou B e, comprometimento da função efetora de macrófago (CORRIER, 1991). A aplasia do timo e bursa de Fabricius reduz o número e atividade de células T, suprime atividade fagocitária e reduz componentes humorais como complemento (C4), interferon e

imunoglobulina - IgG e IgA, desencadeando infecção concomitante, sobretudo por agente viral e bacteriano (GHOSH, 1990; PESTKA; BONDY, 1990; PIER, 1992).

O efeito de aflatoxina na produção de ovo também tem sido observado após dias ou semanas pós-ingestão de ração contaminada, com queda na postura, precedida pela redução no nível proteico e lipídico sanguíneo da ave. As poedeiras alimentadas com 20 mg/kg de aflatoxina na dieta durante 7 dias reduziram a produção a partir do 8º dia, além de reduzir o tamanho com redução proporcional de gema, provavelmente devido ao dano na síntese proteica e lipídica (GARLICH et al., 1973). Um aumento na resistência de casca também ocorreu em ave consumiram ração contaminada (WASHBURN et al., 1985).

Ocorrência em alimento – perigo à cadeia produtiva de ovo em agronegócio

Os produtos de origem vegetal destinados à composição de alimentos e rações constituem as principais matérias primas expostas à contaminação por micotoxinas, citando-se o milho, amendoim, trigo, arroz, castanha do Pará, nozes, castanha de caju, amêndoas, pistache, frutas secas, temperos, semente de algodão, mandioca, óleos vegetais, cacau, leite e produto lácteo, ovo, chá, entre outros (AZEVEDO et al., 1994). Após a ingestão de alimento contaminado, os resíduos de micotoxinas podem permanecer no tecido animal como fígado de ovino, suíno e ave de corte, em leite e ovo, constituindo-se em fonte de contaminação indireta para consumo humano (BULLERMAN et al., 1984).

A ocorrência e intensidade na contaminação de aflatoxina em produtos agrícolas variam em função de fatores genéticos, geográficos e estacionais, assim como condição de cultivo, colheita e armazenagem. A contaminação de alimentos e rações animais com *Aspergillus* spp. e aflatoxina apresenta distribuição mundial, sendo um problema relevante em países de clima tropical úmido. No Brasil, a contaminação de alimentos destinados ao consumo humano é frequente, com aumento da ocorrência nos meses de maior umidade e temperatura (COULOMBE, 1991; SANTURIO, 1999).

A contaminação de produtos agrícolas ocorre através de esporos fúngicos disseminados no ambiente, especialmente no solo, durante procedimento de colheita e secagem. Práticas incorretas de colheita e armazenagem e lesão na superfície de grão por insetos favorecem a contaminação e crescimento fúngico (CHU, 1991). Salienta-se o aumento no teor de aflatoxina, com níveis acumulando ao longo da cadeia produtiva, devido à característica altamente estável em diferentes fatores biótico e abióticos (QUEZADA et al., 2000).

Consequentemente, o controle e monitoramento em todos os produtos de origem vegetal, em especial o milho destinado a ingrediente de ração de animais confinados, torna-se fator essencial para evitar a origem de contaminação residual em produtos de origem animal. A qualidade de milho associada à contaminação por fungo e micotoxinas no Estado do Paraná, classificada entre os maiores produtores de grão brasileiro, tem sido estudada desde a década de 1980, cuja primeira publicação nacional envolveu surtos em equídeos alimentados com milho contaminado com fumonisina B₁ e B₂ (SYDENHAM et al., 1992). Avaliando a contaminação natural de micotoxinas em milho recém-colhido (safra 1994/1995) de Regiões Paranaenses, fumonisina e aflatoxina ocorreram em 98% e 11,3%, respectivamente, sendo a co-ocorrência observada em todas as amostras aflatoxina-positivas, com ênfase à Região Centro- Oeste (ONO et al., 2001). Estudo subsequente envolveu amplo monitoramento em tempo real na cadeia produtiva de milho (safra 2003-2004) e pontos críticos (campo, recepção e pré-secagem em Cooperativa e indústrias) em Norte Paranaense, obtendo-se resultados bastante promissores – baixa contaminação perante perigo através de consumo desta matéria prima (HIROOKA et al., 2015).

Assim, o monitoramento de milho paranaense tem indicado ocorrência generalizada de fumonisina, mas baixa de aflatoxina, aliada a uma tendência decrescente de micotoxinas (HIROOKA et al., 2015). Ishikawa et al. (2016) retificaram a repercussão da ocorrência de aflatoxina em matéria prima avaliando exposição à AFM₁ em leite materno da Região – subentende-se contaminação através do consumo de produtos de origem vegetal local – com negatividade de 94,7%. As amostras de leite materno com contaminação residual de AFM₁ apresentaram a média de $0,018 \pm 0,005$ ng/g. Em contraste, o leite em pó nacional e importado comercializado apresentaram 43,8% de positividade (variação de n.d.–0.046 ng/g com média de $0,024 \pm 0,01$ ng/g), indicando provável contaminação de leite animal destinado à industrialização oriunda do consumo de ração processada com produtos de origem vegetal de outras localidades.

Analisando 74 amostras de produto à base de milho adquirido no comércio entre 1999 e 2001 em Recife-PE, 6,76 % apresentaram AFB₁ com teor máximo de 20 µg/kg (MAZIERO e BERSOT, 2010). Sekiyama et al. (2005) analisando 121 amostras de alimentos à base de milho em Maringá-PR, detectaram três positivas para AFB₁ (8 a 59 µg/kg) e duas para AFB₂ (2,4 µg/kg). Outrossim, Machinski et al. (2001) analisando 110 amostras de milho recém-colhido em Estado de São Paulo, detectaram 54,5% de contaminação com AFB₁, com níveis entre 6 a 1600 µg/kg.

A Tabela 4 apresenta a ocorrência de AFB₁ em amostras de milho e ração para aves no período de 2007 a 2013.

Tabela 4. Ocorrência de AFB₁ em milho e ração destinado para ave.

	País	Ocorrência (positivos/total)	Variação (µg/kg)	Média (µg/kg)	Referências
Milho	Índia	31/35	0,11-4030,47	2,6	Prathapkumar, 2007
	Camarões	7/77	2,0-42,0	1,0	Kana <i>et al.</i> , 2013
	Marrocos	16/20	0,23-11,2	1,57	Zinedine <i>et al.</i> , 2007
Ração	Índia	14/14	0,38-108,61	37,88	Prathapkumar, 2007
	Camarões	28/30	2,0-52,0	11,1	Kana <i>et al.</i> , 2013
	Marrocos	14/21	0,05-5,38	1,26	Zinedine <i>et al.</i> , 2007
	Rio de Janeiro- BR	36/36	1,3- 80	65,3	Fraga <i>et al.</i> , 2007

Analisando micotoxinas em milho e resíduos destinados à alimentação de aves em Norte do Paraná, a contaminação média por fumonisina variou de 239 a com 23.676 µg/ g, enquanto aflatoxina e tricotecenos mantiveram-se em níveis próximos ao limite de detecção da metodologia (SOUZA *et al.*, 2013). Avaliando a ocorrência de fumonisinas e aflatoxinas em quatro tipos de ração para frango de corte (n = 158), Norte do Paraná, a aflatoxina ocorreu em 72,1% das amostras em níveis médios variando de 2,22 a 6,41 ng/g, sendo que a maioria de amostras aflatoxina positiva (97%) mostrou níveis abaixo do limite máximo permitido pela Comissão Europeia de 0,02 mg/kg AFB₁ (ROSSI *et al.*, 2013). Para estimar o grau de exposição de galinha poedeira a micotoxinas, um total de 95 amostras de ração coletadas de jan-dez/2010 de Fazenda Experimental da Universidade, Norte do Paraná, as aflatoxinas e fumonisinas foram detectadas em 69,7% e 89,5% da ração (n = 95) destinado para poedeiras com níveis médios de 9,61 ng/g e 1,28 µg/g, respectivamente. A ingestão diária estimada de FB₁ para galinhas poedeiras (0,038 mg/kg de peso corpóreo/dia) foi abaixo de LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*, 2 mg/kg de peso corporal/dia). A maioria das amostras positivas (85,1%) apresentaram os níveis de aflatoxina abaixo do máximo permitido limite pela Comissão Europeia (EC 1881, 2006).

Os dados sobre contaminação de micotoxinas repercutiriam diretamente no agronegócio globalizado, cuja avaliação de perigo é um fator decisivo perante deliberação visando importação de um país produtor. A exemplo, a avaliação de aflatoxina (AF) em milho brasileiro e ração para frango de corte, com a média de 1.25±0.95 ng/g, i.e., contaminação inferior à legislação imposta pelo país importador – Japão, indicaria baixo perigo de possível contaminação secundária devido à ingestão da carne de frango em questão (BAGATIN *et al.*,

2016). Considerando que a relação de AFB₁ em carne/ração seja inferior a 1/1.000, os dados sugeriram que o frango sob alimentação com o lote investigado estaria enquadrado dentro de condição segura para o consumo humano. Estes dados constituem impacto positivo, evidenciando a perspectiva de ampliação, estendendo também à cadeia produtiva de ovo ao mercado internacional como produto agroalimentar competente; arraigar-se no agronegócio através de exportação baseado em garantia à segurança alimentar acoplada à agregação de valor, contribuindo perante retorno econômico aos produtores.

O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, estando também em crescente produção, ovos para o consumo interno (IBGE, 2017). O Estado do Paraná contribui com a maior produção nacional de frango, além de ser o segundo produtor de milho. A cadeia do milho (*Zea mays* L.) é de especial preocupação na produção de alimentos; produtos de origem animal dependem da qualidade desta matéria-prima, componente principal de ração. A indústria avícola brasileira já é altamente tecnificada e produtiva e, se destaca por ser o maior exportador de carne de frango do mundo (KOTTWITZ et al., 2013)

O ingresso da cadeia produtiva de ovo ao agronegócio globalizado se justifica em vista à qualidade evidenciada através de trabalhos nacionais. O monitoramento perante segurança de milho tem sido relatado desde a década de 80, conforme descrito acima; em paralelo, o estudo de *Salmonella* desde a década de 90 (KOTTWITZ et al., 2012).

O contínuo trabalho iniciado desde 1994, com a cooperação na epidemiologia de salmonelose entre UEL - Laboratório Central do Estado do Paraná, 1999 (LACEN, Curitiba), centrou em isolamento e caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* na cadeia avícola (KOTTWITZ et al., 2008). A análise de ovos de galinha, comercializados em diferentes regiões do Paraná, indicaram que ovos provenientes de granjas de postura comercial apresentam baixo risco de transmissão de *Salmonella* para consumidor humano. Os ovos de descarte de incubação de aves de corte, ao contrário, parecem representar uma importante fonte de infecção e, só devem ser utilizados industrializados (KOTTWITZ et al., 2011). Em relação à carne de frango, observou-se diminuição do isolamento de *Salmonella* spp. e *Salmonella* Enteritidis no Paraná nos últimos anos (KOTTWITZ et al. 2013). O fato provavelmente se deve ao Programa Nacional de Redução de Patógenos, implantado em 2003 em estabelecimentos de abate, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), Depto de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil. A diminuição gradativa de *Salmonella* spp. também

seja decorrente de vacinação para *Salmonella* Enteritidis das matrizes de corte (KOTTWITZ et al. 2012).

A inserção gradativa da cadeia de ovo/produtos derivados ao mercado internacional apresenta possibilidade promissora, inclusive com agregação de valor através de industrialização, iniciando-se com produtos desidratados (REGO et al., 2012). Outrossim, a efetivação deve ser complementada através da investigação de produto final, principalmente referente ao perigo de resíduos tóxicos naturais – as micotoxinas em ovo.

Legislação

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde - Brasil regulamentou o limite máximo tolerável (LMT) de micotoxinas em produtos destinados à alimentação humana através de Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 7 de 18/03/2011 (BRASIL, 2011). A legislação estabeleceu o LMT de aflatoxina total ($B_1+B_2+G_1+G_2$) em 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para milho, amendoim e derivados e castanha-do-Brasil com casca para consumo direto; 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para feijão, cereais e derivados; 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para fórmulas infantis para lactentes e crianças de primeira infância, entre outros alimentos. O limite máximo tolerável para outras micotoxinas- ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FUM), patulina (PAT) e zearalenona (ZEA) também é estabelecido por esta RDC (BRASIL, 2011).

Por outro lado, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regulamentou, através da Portaria nº 07, de 09 de novembro de 1988 (BRASIL, 1988) entre os limites máximos de contaminação de matéria prima destinada à alimentação animal determinados nesta Portaria, a aflatoxina é a única micotoxina com limite máximo definido, com valor máximo de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sendo ainda mantido em vigor.

A legislação da Comunidade Europeia estabelece, por meio da EC nº 1881/2006 LMT de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo humano. O limite máximo de AFB_1 estabelecido para amendoim, nozes em geral e frutas secas para consumo direto ou como ingrediente é de 2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e de aflatoxinas totais 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; amendoim a ser submetido a triagem ou outro tratamento físico antes do consumo humano é de 8,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AFB_1 ; 2,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AFB_1 para cereais e produtos processados com exceção de milho a ser submetido a triagem que possui LMT de 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AFB_1 ; leite tratado termicamente e leite *in natura* ou leite destinado para fabricação de produtos à base de leite (0,05 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AFM_1);

fórmulas infantis e leite infantil ($0,025\mu\text{g}/\text{Kg}$ de AFM_1), entre outros alimentos. A EC nº 1881/2006 também regulamenta o LMT para OTA, DON, FUM, PAT, ZEA (EC 1881, 2006).

Metodologia analítica na determinação de aflatoxina

Para um controle e monitoramento eficientes dos alimentos susceptíveis à contaminação, os laboratórios devem dispor de técnicas analíticas com sensibilidade, especificidade, rapidez e facilidade de uso, além de exatidão e precisão. Existem vários fatores que dificultam este tipo de análise como, por exemplo, a distribuição não uniforme das micotoxinas nos lotes contaminados, concentrações das micotoxinas serem extremamente baixas (da ordem de partes por bilhão), extratos usualmente estarem acompanhados de lipídios e pigmentos interferentes, necessitando de uma fase de limpeza, e a natureza variada das amostras, as quais requerem diferentes procedimentos na extração (OLIVEIRA et al., 2000).

O desenvolvimento do primeiro método para determinação de aflatoxina em alimento ocorreu com a descoberta da toxina na década de 60, com base em propriedade fluorescente sob exposição à luz ultravioleta (OPAS,1983). A técnica fundamentada em cromatografia de camada delgada (CCD) é usada para fins qualitativos e semiquantitativos. Aflatoxina é quantificada por comparação simultânea entre *rf* do *spot* de amostra com o padrão de toxina sob luz UV, ou medidas densitométricas. Esta técnica apresenta como vantagens rapidez, baixo custo, e facilidade na detecção de compostos na faixa ultravioleta-visível (UV-visível). Algumas desvantagens do método são a necessidade de fazer pré-tratamento de amostra, utilização de alta quantidade de solventes e falta de automatização. Esta técnica foi amplamente utilizada para fins quantitativos entretanto, devido à grande susceptibilidade a falsos positivos e superestimação de concentração a sua aplicação tem sido, atualmente, mais direcionada a análises de triagem, com utilização principalmente, de cromatografia líquida-espectrometria de massas (LC-MS) como técnica de escolha em análises de confirmação (JAIMEZ et al., 2000; TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é considerado o método padrão para análise de micotoxinas. Nesta técnica, diferentes adsorventes podem ser utilizados conforme as características físico-químicas das moléculas, são utilizadas colunas em fase normal ou reversa para separação e purificação das toxinas, a escolha dependerá da

polaridade da toxina. Os detectores mais comuns são o detector por UV ou fluorescência (EDINBORO & KARNES, 2005; CALLERI et al., 2007). Algumas micotoxinas possuem cromóforos fluorescentes naturais em sua estrutura molecular, entre elas estão aflatoxina, ocratoxina e citrinina, podendo ser detectadas diretamente. Fumonisina está entre as micotoxinas que não possuem cromóforo natural e sua análise por fluorescência requer derivatização da molécula. Entretanto, estes procedimentos de derivatização demandam tempo e podem aumentar a probabilidade de erros nas análises (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009).

Devido à complexidade das matrizes envolvidas, a análise de aflatoxina por CLAE requer morosos passos, incluindo amostragem e preparo de amostra, extração, purificação e concentração do extrato, sendo etapas de fundamental importância para garantir a correta separação, quantificação e confirmação. Não existe um único método adequado de extração, devendo-se analisar as propriedades físico-químicas de cada matriz. As AFs são geralmente extraídas com metanol, acetona e clorofórmio por serem ligeiramente solúveis em solventes polares e insolúveis em solventes totalmente apolares. A etapa de extração/limpeza de amostra pode ser realizada por partição líquido – líquido, colunas de imunoafinidade constituída por anticorpo específico e colunas de extração em fase sólida (sílica, C₁₈, C₈, entre outros) (JAIMEZ et al., 2000).

O acoplamento à espectrometria de massas possibilitou análise de compostos em menor limite de detecção, reduziu a necessidade de derivatização, permite análise de grande variedade de compostos e gera informações estruturais de analitos. Trata-se de técnica robusta e sensível, porém possui alto custo de operação, requer reagentes de alta pureza e operadores treinados, impossibilitando emprego na rotina laboratorial *in loco* (ONO et al., 2006b; BERTHILLER et al., 2007; TABARI et al., 2011).

A inovação no início dos anos 80 consistiu da introdução de métodos imunoquímicos como método simples e rápido, destinados para a análise de micotoxinas, (OLIVEIRA e GERMANO, 1996). Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) tem destaque entre os métodos imunoquímicos pioneiros na detecção rápida visando triagem de micotoxinas. (CALLERI, 2006; XIULAN et al., 2006). Método ELISA é uma alternativa simples e econômica em relação aos métodos instrumentais químicos, sendo indicado para triagem rápida na análise de micotoxinas em matrizes alimentares (XIULAN et al., 2006)

A variabilidade de reagentes comerciais depende da qualidade de Anticorpo (Ac) selecionado para obtenção do reagente. Especificidade, sensibilidade e reatividade-afinidade de Ac destinado à produção de kits contra mesma micotoxina varia conforme grupo técnico-científico responsável pela inovação e desenvolvimento para a Empresa. *Kits* comerciais de ELISA disponíveis para detecção de micotoxinas são baseados em um sistema competitivo direto ou indireto. No sistema competitivo direto o anticorpo é imobilizado na placa e se liga especificamente a sítios do antígeno (se estiver presente na amostra), são adicionados marcadores colorimétricos, anticorpos marcados com enzimas responsáveis pelas reações com emissão de cor, esses anticorpos se ligarão a outro sítio específico do antígeno imobilizado, a intensidade da coloração gerada é diretamente proporcional à concentração dos antígenos presentes na amostra. O princípio de ic-ELISA fundamenta-se na competição entre micotoxina presente na amostra com a toxina imobilizada na microplaca, perante o mesmo sítio específico do Ac. A concentração de toxina na amostra é indiretamente quantificada pela reação procedente de Ac específico anti-micotoxina absorvido à superfície sensibilizada, que atua como sítio de ligação ao anti-IgG (Ac secundário) marcado com enzima, responsável pela reação colorimétrica (FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004 e LI; ZHANG; ZHANG, 2009).

Ensaio ELISA é rápido e apresenta alta especificidade, com limites de detecção comparáveis aos obtidos por métodos cromatográficos, capaz de detectar traços de um composto (ng ou pg) com pouca ou nenhuma necessidade de limpeza e concentração do analito, dentre as desvantagens estão possíveis resultados falso positivos, pela possibilidade de reações cruzadas dos anticorpos com outros componentes que não micotoxinas, e falsos negativos, sendo a validação desse ensaio essencial para confiabilidade dos resultados (ANKLAM; STROKA; BOENKE, 2002, FUJII; GARCIA; HIROOKA, 2004 e TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir com a segurança e qualidade de cadeia produtiva de ovo em crescente expansão, disponibilizando imunoensaio ic-ELISA desenvolvido com anticorpo monoclonal-AcM para análise de aflatoxina, tendo em meta o monitoramento em larga escala com custo acessível ao setor produtivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Selecionar as granjas para obter as amostras de ovo, tendo como diferencial o sistema de coleta e classificação.

Avaliar os parâmetros de qualidade de ovo (peso médio, percentual de casca, massa de gema e massa de clara).

Padronizar e otimizar o ic-ELISA utilizando AcM antiaflatoxina produzido pelo hibridoma AF4 para análise de ovo.

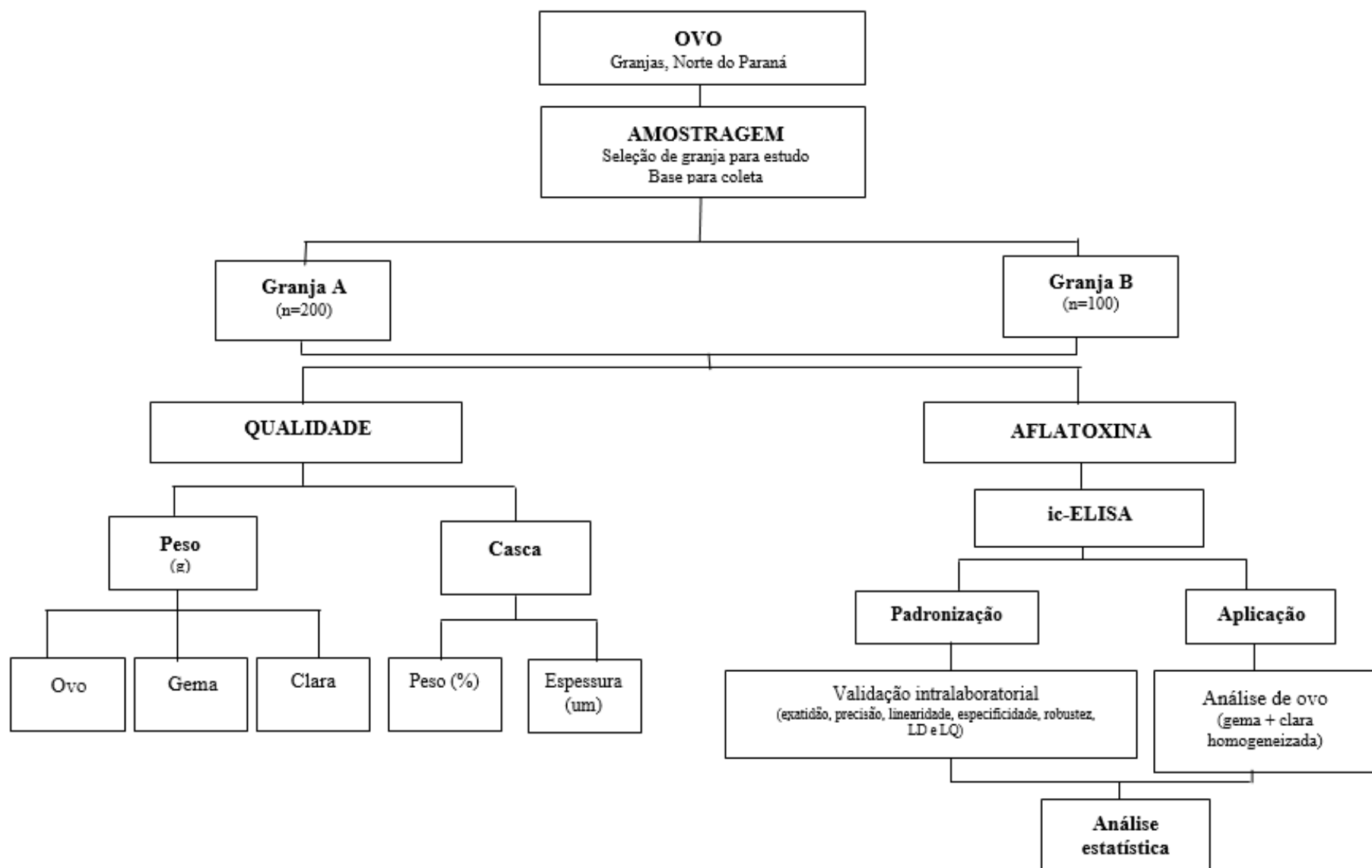
Aplicar o ensaio ic-ELISA desenvolvido para análise da contaminação de aflatoxina em amostras de ovo coletadas em duas granjas selecionadas conforme item acima.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As granjas para o estudo foram selecionados conforme orientação do Responsável Técnico Veterinário Geraldo Masahiro Hayashi, baseado em: capacidade de produção com plantel mínimo de 10.000 galinhas poedeiras; produção de ovo para consumo direto e sistema de coleta (manual ou automatizada) executada por produtores da Região Norte do Paraná. Assim sendo, a escolha de duas granjas estudadas fundamentaram em: capacidade de produção e diferentes sistemas de coleta.

As duas granjas produzem ovos para consumo direto. Após triagem, ovos dentro dos padrões de qualidade são classificados por peso e embalados para comercialização e ovos trincados são encaminhados a indústrias. A amostragem foi realizada antes da coleta e triagem de ovo. A Figura 6 apresenta o fluxograma de experimentos realizados.

Figura 6. Fluxograma geral do experimento.

4.2 DADOS DE GRANJA

Os dados das poedeiras de respectiva granja em estudo foram disponibilizados pelos proprietários, conforme consta na Tabela 5.

Tabela 5. Dados de granjas.

Granja	Linhagem	Nascimento	Lote analisado (n° de ave)	Plantel (total de ave)
A	Hisex White	15/09/2015	19.800	260.000
B	Nick Chick	18/08/2015	6.885	60.000

Fonte: Informação fornecida pelo proprietário de granja.

A Tabela 6 apresenta a formulação de ração utilizada nas duas granjas, sendo ambas usadas na fase da postura. A quantidade de ração apresentada consistiu de quantidade suficiente para abastecer três dias.

Tabela 6. Formulação de ração utilizada na granja.

Ingredientes	Quantidade (Kg)	
	Granja A	Granja B
Milho	1193,00	590,00
Farelo de soja	500,00	230,00
Farinha de carne	50,00	72,00
Óleo de soja	46L	15L
Calcário moído	96,00	41,00
Calcário pedrisco	100,00	-
Farinha de ostras	-	41,00
Sal comum	7,40	3,00
Bioplex TR Selênio	-	0,50
Metionina	2,00	-
Protexin concentrante (probiótico)	-	0,05
Biocholine	0,30	-
Adsovente Grasp	4,00	-
Amina Blend	3,00	-
Enzimas	2,00	-
Postura 04	4,00	-
Núcleo (vitaminas, minerais e aa)	-	2,50
Núcleo anti-stress (vitaminas A, D, E e K)	-	1,00
Total	2000,00	997,00

Fonte: Informação fornecida pelo proprietário de granja.

A figura 8 apresenta o galpão de aves da granja A com cinco andares de gaiolas, enquanto o galpão da granja B continha três andares de gaiolas; quatro aves mantidas em cada gaiola. A figura 9 apresenta o sistema de coleta de ovos automatizado da granja A com medição de temperatura e sistema de gotejamento de água no teto para controle de umidade. A coleta na granja B consistiu de procedimento manual, sendo o sistema sem medição de temperatura e controle perante gotejamento de água.

Figura 7. Galpão de galinha poedeira, Arapongas - PR.



Granja A

Granja B

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8. Sistema automatizado de coleta de ovo, silo de ração e sistema de gotejamento de água na granja A, Arapongas - PR.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 AMOSTRAGEM

A coleta foi realizada entre abril e agosto de 2016, semanalmente, perfazendo um total de 20 coletas.

Foram colhidos, aleatoriamente, 50 ovos da granja A e 25 ovos da granja B por dia de coleta. Os ovos foram acondicionados em bandeja de papelão, transportados em caixa de isopor à temperatura ambiente e mantidos a 4°C até a data de quebra.

Em laboratório, as amostras foram identificadas e pesadas em balança eletrônica. Posteriormente, foi realizada a quebra manual, em copos descartáveis, onde clara e gema foram separados para pesagem. Após a pesagem, as amostras foram homogeneizadas (clara e gema) e armazenadas em tubos de propileno a -18°C até a data de análise.

4.4 PARÂMETROS AVALIADOS PARA A QUALIDADE DE OVO

4.4.1 Determinação do peso médio de ovo

As amostras foram pesadas em balança analítica de precisão de 0,001 g (Shimadzu AW 220, Filipinas) para obtenção do peso médio.

4.4.2 Componentes de ovo

Para quantificação dos componentes dos ovos foram avaliados o peso da gema, clara e percentual de casca. As amostras foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g (Shimadzu AW 220, Filipinas).

As gemas de cada amostra (*pool* de 5 ovos) foram pesadas e registradas, e as respectivas cascas foram lavadas e secas à temperatura ambiente para posterior obtenção de seu peso. O peso da clara foi obtido pela diferença entre a massa do ovo inteiro e a soma dos pesos da gema e da casca.

4.4.3 Espessura da casca

A espessura da casca seca foi obtida através da medição em dois pontos distintos utilizando o micrômetro manual (Mitutoyo Micrometer 25 mm, Japão).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE AFLATOXINAS

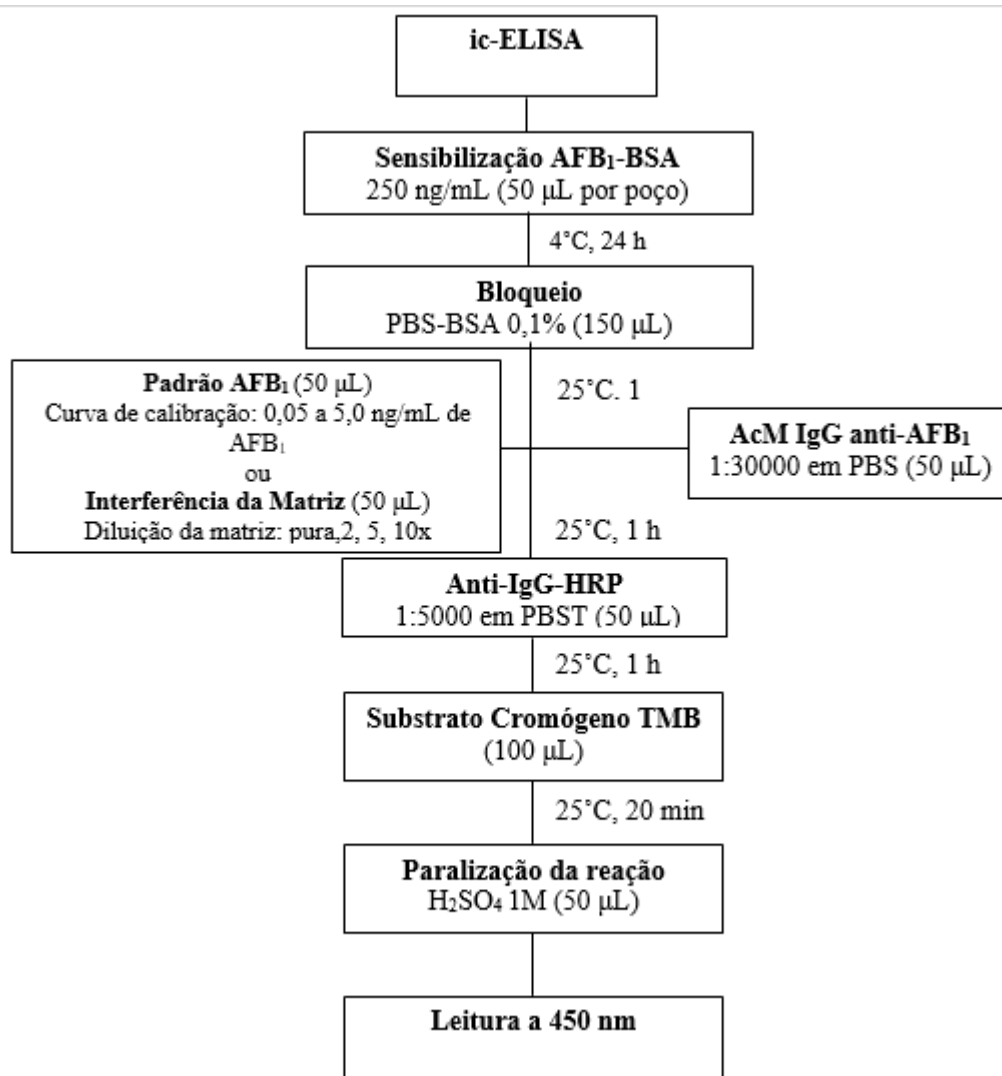
O imunoensaio enzimático *Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ic-ELISA) foi padronizado e otimizado utilizando anticorpo monoclonal AF4 (AcM) para análise de aflatoxinas em ovo.

4.5.1 Extração de aflatoxinas

A extração foi realizada conforme descrito no kit comercial RIDASCREEN® Aflatoxin Total para análise de aflatoxinas por ELISA (R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Alemanha), adaptado. Uma alíquota de 5 g de amostra de ovo congelada foi adicionada de 25 mL de solução metanol grau HPLC:H₂O (70:30, v/v) e 0,5 g de NaCl. A mistura foi agitada a 150 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente, filtrada qualitativamente, seguida de membrana de vidro de 45 µm (Mascherey-Nagel, Alemanha). Alíquotas de 500 µL do filtrado foram secas em banho a 40°C sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspensão em 500 µL de Tampão Fosfato de Sódio-Tween (PBS + 0,05% Tween 20) PBST:metanol (9:1, v, v) e diluído no fator de 1:2 no mesmo solvente.

4.5.2 Elisa competitivo indireto

Figura 9. Padronização ic-ELISA: curva de calibração e interferência da matriz (especificidade).



Procedimento

ELISA competitivo indireto foi realizado seguindo o protocolo descrito por Kawamura *et al.* (1988) adaptado conforme nossa condição laboratorial. As microplacas foram sensibilizadas com 50 µL de AFB₁-BSA (250 ng/mL, Tampão PBS 0,015 M pH 7,3) e incubadas a 4°C por 24 h. Após 3 lavagens com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20), as placas foram bloqueadas com 150 µL solução albumina de soro bovino (BSA) 0,1 % em PBS e incubadas por 4 h a 25°C. Após 3 lavagens com PBST, foi adicionado 50 µL de padrões AFB₁ ou amostra diluída, seguida de 50 µL AcM anti-AFB₁ (1:30000 em PBS) produzido em cultivo em H-SFM (1:10000 em PBST), procedendo reação em triplicata, sendo incubado a 25° C por 1h. Este AcM IgG anti-AFB₁ apresentou reatividade cruzada com AFB₁ (100%),

AFB₂ (2,3%), AFG₁ (3,4 %) e AFG₂ (2,4%), mostrou baixa reatividade cruzada contra AFL₁, AFL₂, AFM₁, AFQ₁, AFP₁ e AFB_{2a} (KAWAMURA *et al.*, 1988). A placa foi lavada 3 vezes com PBST, adicionada de 50 µL de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com *horseradish peroxidase* (1:5000 em PBST) e incubada a 25° C por 1 h. Após 6 lavagens com PBST, 100 µL da solução de substrato cromógeno TMB foi adicionado. Após 20 min a 25° C, a reação enzimática foi paralisada com 50 µL de H₂SO₄ 1 M e a absorvância lida a 450nm.

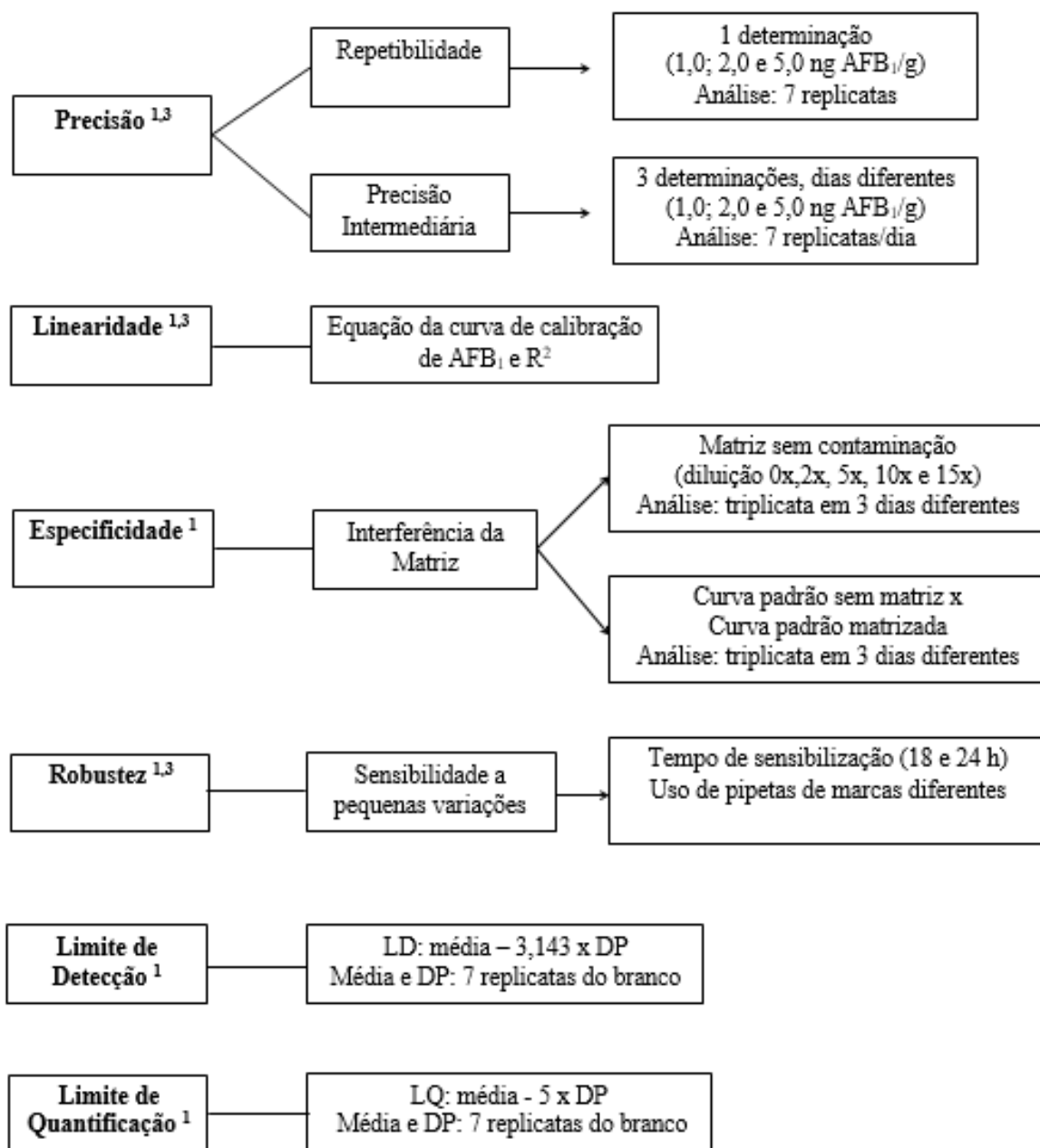
A média de absorvâncias foi calculada a partir de valores individuais obtidos e os resultados expressos em porcentagem de ligação:

$$\% \text{ ligação} = (A^+/A^-) \times 100$$

Onde A⁺ corresponde à média de absorvância na presença de amostra ou padrão, enquanto que A⁻, a média da absorvância na ausência de toxina (controle negativo). A concentração de AFB₁ foi determinada pela curva padrão (0,05 a 5 ng/mL de AFB₁), plotando a porcentagem de ligação contra log da concentração de AFB₁.

4.6 VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE ic-ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DE AFB₁

Figura 10. Validação intralaboratorial de ic-ELISA para análise de AFB₁ em ovo.



(¹INMETRO, 2007.; ²CE nº401/206 e ³ANVISA, 2003).

Os parâmetros avaliados para a validação intra-laboratorial do método foram: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), especificidade, precisão, exatidão, e robustez.

A Linearidade foi avaliada pela equação de regressão linear e coeficiente de determinação (R^2) utilizando cinco pontos da curva de calibração (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). O Limite de Detecção do método (LD) foi obtido pelo cálculo de 3,143 vezes o desvio padrão do branco da amostra em 7 replicatas (INMETRO, 2007) e o Limite

de Quantificação (LQ) foi definido, calculando a média e 10 x desvio padrão dos valores de absorvância do branco padrão, obtidos em 7 replicatas (INMETRO, 2007).

A especificidade foi avaliada com base nos dados obtidos pela interferência da matriz sem contaminação, a porcentagem de ligação da matriz (50µL matriz diluída + 50 µL do AcM 1:30.000) foi comparada a porcentagem de ligação do AcM (50µL metanol:PBST (1:9, v/v) + 50µL do AcM 1:30.000). As soluções do extrato da matriz foram diluídas 0x, 2x, 5x, 10x e 15x em metanol:PBST (1:9, v/v). Posteriormente, foi feita a comparação entre a curva padrão obtida na presença da matriz, onde os pontos da curva foram solubilizados no extrato da matriz diluído pelo fator pré-definido, com a curva padrão na ausência da matriz, com os pontos da curva solubilizados em metanol:PBST (1:9, v/v). Dois métodos comparativos foram usados, de acordo com o INMETRO, sendo a análise de médias pelo teste t (*Student*) e a análise dos desvios entre a curva de referência e a curva matrizada – porcentagem de interferência (INMETRO, 2007).

A exatidão foi avaliada através da metodologia de recuperação, utilizando três concentrações na faixa linear (1,0; 2,0 e 5,0 ng/g de AFB₁) para contaminar artificialmente um *pool* de amostras de ovo, procedendo extração (item 4.5.1) e determinação de aflatoxina (item 4.5.2) em três repetições em triplicata (INMETRO, 2007; Regulamento (CE) nº 401/2006, 2006). A precisão intermediária foi determinada pela precisão inter-corrída, avaliada através de três concentrações analisadas, em sete replicatas em três dias diferentes (INMETRO, 2007; ANVISA, 2003). A precisão foi avaliada por repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade, realizada pela precisão intra-corrída, foi avaliada através de três concentrações analisada, em sete replicatas no mesmo dia.

A robustez foi avaliada pela execução de curvas padrão, variação no tempo de sensibilização da placa (18 e 24h), e uso de pipetas de marcas diferentes para preparo das soluções de AcM anti-AFB₁ e anti-IgG-HRP (INMETRO, 2007; ANVISA, 2003).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados paramétricos gerados na validação do ic-ELISA foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido do Teste de Tukey, considerando-se o nível de 5% de significancia, utilizando o software RStudio (1.0.153).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos em formato descritivo, onde foi avaliado a qualidade de ovo comparando duas granjas distintas, selecionadas conforme capacidade de produção, sistema de coleta (manual ou automatizada) e produção de ovo para consumo direto. Seguida de análise de aflatoxinas empregando ic-ELISA padronizado e validado intralaboratorialmente.

Os tópicos constam conforme abaixo:

- Parâmetros de qualidade de ovo, avaliando-se o peso do ovo, gema e clara, percentual de casca, assim como avaliação macroscópica da casca do ovo;
- Validação intralaboratorial para análise de aflatoxina por ic-ELISA;
- Parâmetros de segurança de ovo, quantificando-se a aflatoxina por ic-ELISA desenvolvido no laboratório e,
- Apêndice contendo os dados detalhados de cada amostra referente a parâmetros de qualidade e segurança – aflatoxina.

5.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE

Diversos fatores afetam a composição da casca e conteúdo interno de ovo, comprometendo a qualidade, com ênfase a genética, idade da ave, nutrição, doença e práticas de manejo. Soma-se ainda entre fatores de impacto a qualidade de água para consumo, densidade populacional, temperatura, fatores de estresse, transporte e armazenamento de ovo (VILELA, 2012; CARVALHO e FERNANDES, 2013).

A casca representa entre 9 a 14% do peso de ovo, sendo a espessura e percentual diretamente afetados pela idade da ave. O peso da casca permanece relativamente constante, enquanto o peso do ovo aumenta com a idade (SALVADOR, 2011; CARVALHO e FERNANDES, 2013).

A Tabela 7 apresenta o resultado geral dos parâmetros de qualidade de ovo, avaliando-se o peso do ovo, gema e clara, bem como avaliação macroscópica da casca. Embora não houvesse diferença na cor, textura e tamanho de ovo entre as granjas, ocorreu diferença significativa no peso de ovo, gema e clara comparando as duas granjas ($P < 0,5$). O fato pode ser devido a diferença de linhagens de poedeira, sendo *Hisex White* criada na granja A bastante disseminada na criação regional, enquanto que *Nick Chick* de granja B consistiu de linhagem com maior resistência a condições de criação. Leandro et al. (2005) também

obtiveram os valores semelhantes à Tabela 7 analisando ovo branco adquirido em diferentes pontos de venda em Goiânia-BR, com peso médio de clara entre 39,39 g e 30,12 g e media de gema entre 16,53 g e 17,57 g. FREDRIKSSON et al. (2006) analisando gema de ovo de poedeira branca *Hy-line* obtiveram o peso médio de 20,3 g.

Tabela 7. Parâmetros gerais de qualidade das amostras de ovo analisadas.

GRANJA		PESO (g)			CASCA	
		OVO	GEMA	CLARA	PERCENTUAL (%)	ESPESSURA (mm)
A	\bar{X}	56,24 ^b ± 3,33	16,72 ^b ± 1,41	33,68 ^b ± 2,35	10,4 ^a ± 0,86	0,370 ^a ± 0,04
	Faixa	45,32 - 64,99	13,61 - 21,24	26,13 - 43,85	7,9 - 13,8	0,301 - 0,491
B	\bar{X}	58,85 ^a ± 3,40	17,85 ^a ± 1,42	34,98 ^a ± 2,93	10,2 ^a ± 0,71	0,373 ^a ± 0,04
	Faixa	47,04 - 65,30	14,19 - 20,32	31,44 - 40,57	8,2 - 12,6	0,327 - 0,492

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Wilcoxon a 5% de significância (P<0,05).

Vilela et al. (2016), analisando ovo de galinha *Dekalb White* com idade entre 30 e 70 semanas, obtiveram peso médio de 62,75 g, 13,3 % de casca com espessura de 0,336 mm, com os valores superiores ao apresentado na Tabela 7, exceto espessura da casca. Barbosa Filho et al. (2005) analisando ovo de poedeira branca *Hy-line W36* em dois sistemas de criação (cama e gaiola), obtiveram a espessura de 0,45 mm em ambos os sistemas, sendo os valores maiores do que neste trabalho.

Soares (2007) analisando ovo branco, vermelho e caipira adquiridos diretamente de produtores e mercados de Campos dos Goytacazes - RJ, obtiveram o peso de 59,8 g, 61, 86 g e 54,45 g para ovo branco, vermelho e caipira, respectivamente. O ovo branco apresentou o peso de 16,7 g, clara de 37,9 g com 9,18% de casca; o ovo vermelho apresentou gema com 16 g, 39,9 g de clara e 9,52% de casca; o ovo caipira apresentou gema com 18,0 g, clara de 31,54 g e 8,96% de casca.

5.2 AFLATOXINA EM OVO

5.2.1 Validação intralaboratorial de ic-ELISA

A interferência de matriz na analítica é um fator essencial na análise de contaminantes residuais, sendo causada pela composição alimentar bastante complexa. Conseqüentemente, o efeito de intereferentes de matriz alimentar tem sido principal causa de

reações falso positivas em imunoenensaio, pela possibilidade de interação entre determinados componentes do alimento com o anticorpo.

A interferência da matriz foi utilizada para avaliar a especificidade do método. Os extratos de ovo foram submetidos a diluições (puro a 10x) (Figura 11). O extrato puro apresentou 21% de interferência, as demais (2x, 5x e 10x) variaram de 2 a 6 % de interferência. A diluição 2x foi escolhida pois não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das maiores diluições.

Definida a diluição 2x, foram feitas duas curvas com o padrão, uma em que o padrão foi diluído na matriz, a curva matrizada, e uma sem a matriz. (Figura 12). Foi feita a comparação entre as curvas pela análise de desvio (INMETRO, 2007) e obteve-se sobreposição na maioria dos pontos (0,05 ng/mL a 5,0 ng/mL). A similaridade, demonstrada pela análise de médias por teste t (*Student*), comprovou que não houve diferença significativa em nenhum dos pontos da curva ($p > 0,05$).

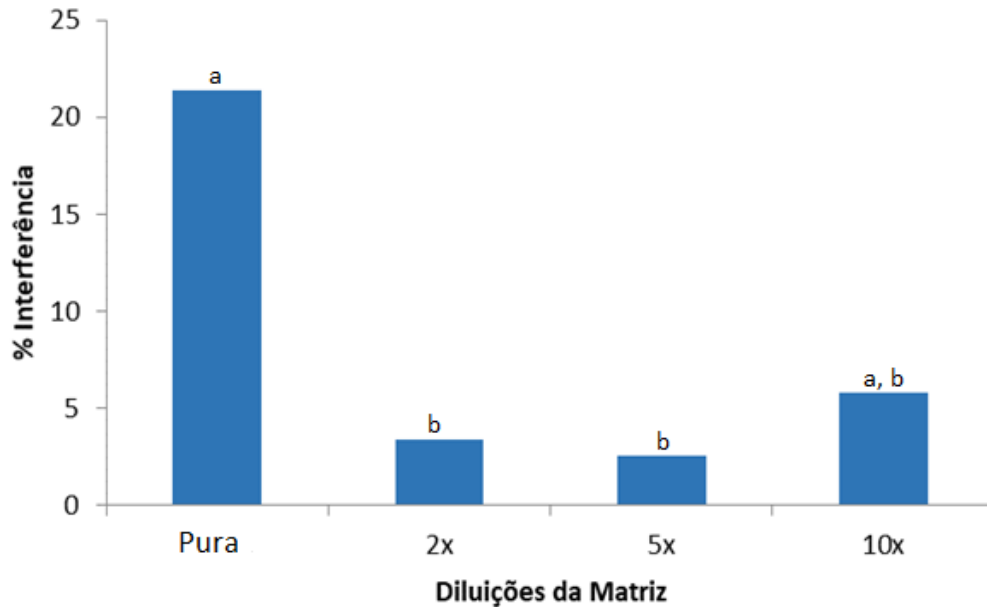
A linearidade do método foi avaliada pela curva de calibração com padrão de AFB₁ (Figura 13). A curva de calibração foi feita com cinco pontos (0,05 ng/mL a 5,0 ng/mL), com equação de regressão linear $y = -14,85 \ln(x) + 47,131$ e $R^2 = 0,9922$, confirmando a linearidade com valor dentro do estabelecido pelo INMETRO ($R^2=0,99$, 2007).

A análise de precisão foi conduzida avaliando repetibilidade e precisão intermediária (Tabela 9). A repetibilidade (precisão intracorrída – análise no mesmo dia) apresentou coeficiente de variação <15% preconizado pela ANVISA (2003) para todas as concentrações testadas, O mesmo ocorreu com a precisão intermediária (precisão intercorrída - análise em diferentes dias).

O limite de detecção (LD) obtido foi de 0,38 ng/g e limite de quantificação (LQ) de 0,71 ng/g. A exatidão do método foi avaliada pela recuperação de AFB₁ em ovo artificialmente contaminado com 1,0, 2,0 e 5,0 ng/g (Tabela 8). A taxa de recuperação em ovo contaminado com 1,0 ng/g apresentou valor médio de 0,9 ng/g \pm 0,12, com recuperação variando de 84,0% a 107,0% (média de 95,5%); com 2,0 ng/g apresentou valor médio de 1,9 ng/g \pm 0,03 e recuperação de 97,% a 109 % (média de 101%) e com 5,0 ng/g obteve valor médio de 4,9 ng/g \pm 0,25 e recuperação de 95,2 % a 104,9 % (média de 99,2 %). A três concentrações avaliadas apresentaram taxa de recuperação dentro de valores recomendados pela CE nº 401/2006, sendo entre 70 a 110 % (1 e 10 µg/kg). Anfonsi et al. (2015) obtiveram

LD de 0,3 ng/g de AFB₁ ao analisarem gema de ovo, pelo método ELISA direto. Os mesmos autores contaminaram amostras de ovo com 1,0, 4,0 e 10,0 ng/g e obtiveram recuperação de 100 %, 98 % e 95 %, respectivamente, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho.

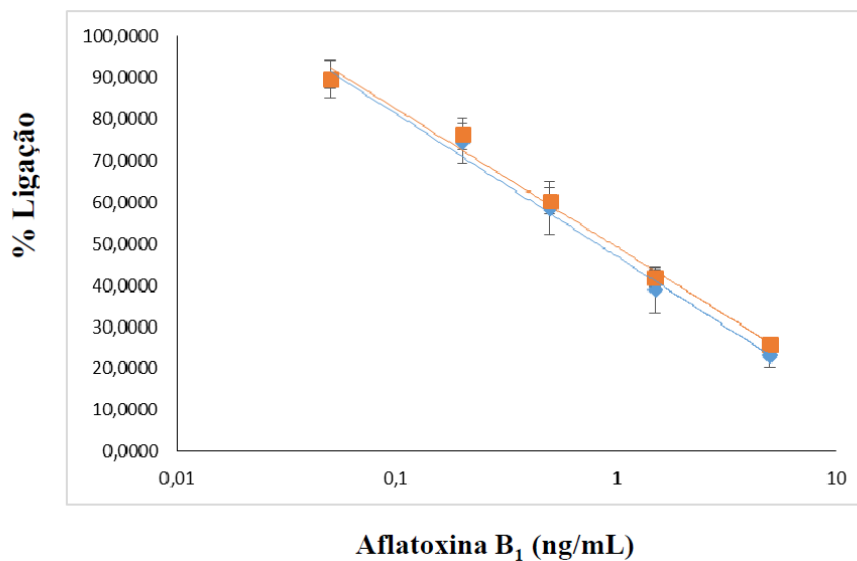
Figura 11. Diluição de matriz visando redução da interferência para determinação de AFB₁ por ic-ELISA em ovo.



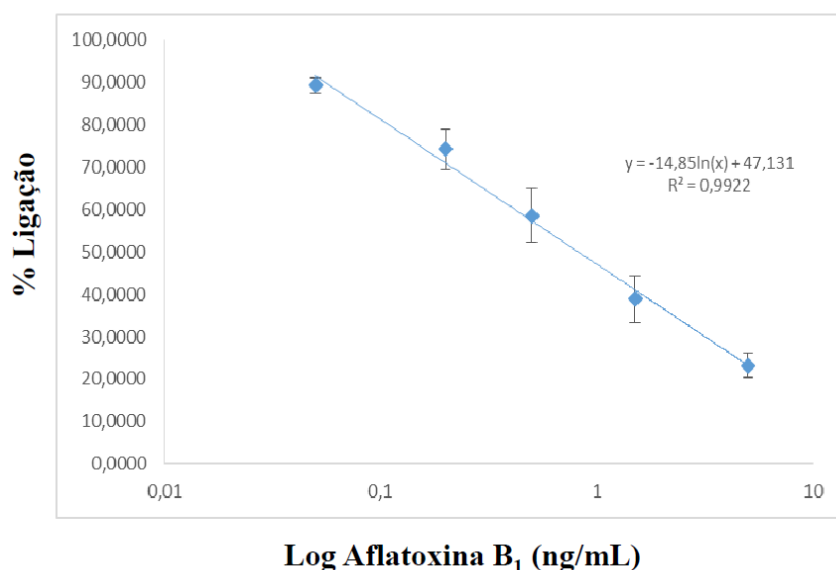
Resultados expressos em média de % de interferência, n=7

^{a-b} Diferença significativa ($p < 0.05$, one-way-ANOVA).

Figura 12. Análise de desvios entre curva padrão e matrizada para determinação de AFB₁ em ovo.



Quadrados e losangos representam a média de % de ligação de três curvas padrão realizadas em triplicata em dias diferentes. Barras representam o desvio padrão.

Figura 13. Curva padrão para detecção de AFB₁ por ic-ELISA.

Cada ponto representa a média da % de ligação correspondente a sete curvas padrão realizadas em dias diferentes. As barras representam o desvio padrão.

Tabela 8. Recuperação de AFB₁ em amostras de ovo por ic-ELISA.

AFB ₁ adicionada (ng/g)	Média ± DP* (ng/g)	CV (%)	Recuperação (%)	Valores de Referência** (%)
1,0	0,9 ± 0,12	12,0	95,5	70 a 110%
2,0	1,9 ± 0,03	1,2	98,3	
5,0	4,9 ± 0,25	5,1	99,2	

* Resultados expressos em média ± DP de três repetições analisadas em triplicata.

** Segundo Regulamento (CE) n° 401/2006, 2006.

Tabela 9. Análise de precisão na determinação de AFB₁ em ovo por ic-ELISA.

AFB ₁ (ng/g)	Repetibilidade ^a		Precisão Intermediária ^b		Valor de referência ^c
	CV (%)	Média (%)	CV (%)	Média (%)	CV (%)
1,0	9,48		14,75		
2,0	12,95	12,0	14,85	14,8	15
5,0	13,54		14,81		

^a Resultados expressos em coeficiente de variação (CV) de uma repetição analisada em sete replicatas para cada concentração.

^b Resultados expressos em coeficiente de variação (CV) de três repetições analisadas em sete replicatas para cada concentração em dias diferentes.

^c Segundo ANVISA, 2003.

5.2 AFLATOXINA EM OVO

A Tabela 10 apresenta a ocorrência de aflatoxina nas amostras de ovo, sendo que não houve diferença significativa entre os níveis de aflatoxina entre as duas granjas ($P < 0,05$). O nível médio de aflatoxina em ovos da granja A foi de $0,85 \mu\text{g/Kg}$ com variação de $0,72$ a $1,12 \mu\text{g/Kg}$, sendo a positividade de $7,5\%$. A granja B apresentou 14% de amostras positivas, com valor médio de $0,95 \mu\text{g/Kg}$ e variação entre $0,71$ e $1,29 \mu\text{g/Kg}$. Jia et al. (2016) estudando o efeito tóxico e resíduo em ovos provenientes de poedeiras alimentadas com ração contaminada por aflatoxina ($123,0 \mu\text{g/Kg}$) e aflatoxina mais zearalenona (ZEA) ($123,0 + 260,2 \mu\text{g/Kg}$) por 42 dias, detectaram resíduo de AFB_1 e AFB_2 após dois dias de dieta, com níveis médios durante os 42 dias de $0,02$ e $0,11 \mu\text{g/Kg}$, respectivamente. O grupo tratado com ração contendo aflatoxinas e zearalenona apresentaram resíduos um dia após o início do tratamento, com níveis médios de $0,07$ e $0,21 \mu\text{g/Kg}$ para AFB_1 e AFB_2 , respectivamente. Não se detectou resíduo de zearalenona em ambos os tratamentos. Os níveis maiores de AFB_1 e AFB_2 em ovo ocorreram em aves tratadas com a combinação AF e ZEA, provavelmente devido ao efeito sinérgico.

Aly e Anwer (2009) analisaram resíduo de aflatoxina B_1 em ovos de 40 galinhas poedeiras alimentadas com ração contaminada nos níveis de 0 (controle), 25, 50 e $100 \mu\text{g/Kg}$ por 60 dias. Aflatoxina B_1 foi detectada nos ovos de todos os grupos alimentados com a ração contaminada a partir do décimo dia de exposição. A concentração em amostras de ovos individuais variou de $0,03$ a $0,09 \mu\text{g/Kg}$, durante 60 dias de tratamento, com valores médios de $0,04$, $0,05$ e $0,07 \mu\text{g/Kg}$ para grupos alimentados com 25, 50 e $100 \mu\text{g/Kg}$ respectivamente, com taxas de transmissão de 625:1, 500:1 e 1428:1; a variação confirma que somente pequenas quantidades de AFB_1 são transferidas, sugerindo excreção de maior quantidade de toxina através de urina e fezes. Conforme os autores, a possibilidade de transmissão de AFB_1 para ovo seja maior em ave exposta à concentração relativamente baixa da toxina, mas sob longo tempo de exposição, relacionado o fato à capacidade reduzida em detoxicar a toxina.

Anfossi et al. (2015) coletaram 50 amostras de ovo, provenientes de grandes distribuidores e de pequenas fazendas localizadas na região noroeste da Itália, durante o período de janeiro a março de 2014. Nenhuma das amostras analisadas apresentou resíduo de aflatoxina acima do LD ($0,3 \mu\text{g/Kg}$).

O valor médio do resíduo de AFB₁ em amostras de ovo analisadas no presente trabalho está próximo aos valores encontrados por Amirkhizi et al. (2015) que analisaram a ocorrência de aflatoxina em 150 amostras de ovo, coletadas aleatoriamente em mercado local de Tabriz – Irã, por um período de 2 meses e mantidas entre 2 e 4°C até data de análise. Os autores encontraram AFB₁ em 28% das amostras analisadas, com níveis médios de $0,74 \pm 0,04$ e $0,94 \pm 0,07$ µg/Kg para amostras provenientes de fazenda (*farm*) e ovos domésticos (*domestic*), respectivamente. Os autores atribuíram a elevada porcentagem de amostras contaminadas à qualidade da ração animal no país.

Lqbal et al. (2014) analisaram 80 amostras de ovo coletadas entre dezembro de 2011 e março de 2012 em mercados locais de Punjab – Paquistão. Dentre as amostras analisadas, 28% apresentaram contaminação média de AFB₁ em $1,39 \pm 0,89$ µg/Kg com variação de 0,05 a 3,19 µg/Kg e Aflatoxinas totais com nível médio de $1,97 \pm 0,94$ µg/Kg com variação de 0,05 a 4,46 µg/Kg, valores acima do que os encontrados neste trabalho. Herzallah (2009) analisaram 10 amostras de ovo coletadas em mercados da Jordânia e obtiveram nível médio de 1,23 µg/Kg de AFB₁.

As Tabelas 12 e 13 apresentam os parâmetros de qualidade e segurança em amostras de ovo que obtiveram valores de contaminação por AFB₁ superior a 0,38 µg/Kg da granja A e B, respectivamente. Pode-se inferir que 58,8 % das amostras positivas da granja A foram coletadas no mês de abril de 2016, valor próximo ao verificado na granja B, onde 50 % das amostras positivas foram coletas no mesmo mês. É provável que o maior índice de contaminação tenha ocorrido no mês de abril 2016 (Tabela 12 e 13) devido a temperatura elevada, a idade jovem das aves, fator estes que podem estar relacionado, visto que animais mais jovens são mais susceptíveis a contaminação por aflatoxina.

Tabela 10. Ocorrência e faixa de contaminação de aflatoxina B₁ detectada em amostras de ovo por ic-ELISA.

GRANJA	n (total)	% ≥ LQ	FAIXA DE CONTAMINAÇÃO					
			≤ LD	> LD < LQ	FAIXA (µg/Kg)	≥ LQ	MÉDIA (µg/Kg)	FAIXA (µg/Kg)
A	200	7,5	183	2	0,69 - 0,70	15	$0,85^a \pm 0,11$	0,72 - 1,12
B	100	14	84	2	0,68 - 0,70	14	$0,95^a \pm 0,22$	0,71 - 1,29

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Wilcoxon a 5% de significância (P<0,05).

LD: 0,38 µg/Kg e LQ: 0,71 µg/Kg.

Os dados referentes a taxa de transmissão de AFB₁ da ração para o ovo estão dispostos na Tabela 11. Nota-se que os valores encontrados entre os autores são bem discrepantes, essa variação pode estar relacionada a diferenças nas concentrações, tempo de exposição, extração e método de quantificação empregados por cada autor.

Tabela 11. Taxa de transmissão de AFB₁ da ração para o ovo.

Taxa de transmissão de AFB₁	Referências
625:1, 500:1 e 1428:1,	Aly e Awner (2009)
4615:1	Bintvihok et al. (2002)
55000-125000:1	Lotzsch e Leistner (1976)
5000:1	Oliveira et al. (2000)
2200:1	Park e Pohland (1986)
40000:1	Trucksess et al. (1983)
66200:1	Wolzak et al. (1985)

Tabela 12. Parâmetros de qualidade e segurança em amostras de ovo que apresentaram valores de contaminação por AFB₁ superior a 0,38 µg/Kg da granja A.

Coleta (mês/2016)	Galpão			OVO						
	Temperatura (°C)	Ração	Ave	Código	Qualidade			Casca		Micotoxina
		Milho (safra)	Idade (semanas)		Total	Gema	Clara	%	Espessura (mm)	Aflatoxina (µg /Kg)
ABRIL	31,0	2015	30	11	55,124	15,648	33,965	10,0	0,4853	0,70
	30,5		30	13	55,452	14,804	34,195	10,0	0,4887	0,69
	30,5		30	18	54,028	15,071	33,687	9,75	0,4095	0,77
	28,4		31	27	53,045	15,143	32,291	10,6	0,4315	0,86
	28,4		31	28	53,092	14,380	33,101	10,6	0,4276	0,81
	28,4		31	30	52,343	15,032	31,789	10,6	0,4423	0,85
	29,0		32	34	60,158	15,662	38,337	10,2	0,3720	0,73
	23,2		33	41	54,944	16,456	32,611	10,7	0,3786	0,80
	23,2		33	45	56,491	15,626	33,948	12,2	0,3598	1,01
	23,2		33	48	55,784	17,026	31,727	12,6	0,3711	0,72
MAIO	19,0	2016	34	54	57,474	17,402	34,017	10,5	0,3565	0,88
	21,3		37	81	53,852	16,381	31,876	10,4	0,3400	0,78
JUNHO	22,0		39	102	54,604	16,417	32,482	10,4	0,3231	1,12
	22,0		39	109	54,674	16,122	32,820	10,5	0,3164	0,93
JULHO	26,1		42	132	55,720	17,011	32,844	10,5	0,3738	0,84
	26,1		42	133	60,313	17,665	36,340	10,5	0,3584	0,78
AGOSTO	29,1		47	190	56,257	18,221	32,266	10,3	0,3213	0,86

LD: 0,38 µg/Kg; LQ: 0,71 µg/Kg.

Tabela 13. Parâmetros de qualidade e segurança em amostras de ovo que apresentaram valores de contaminação por AFB₁ superior a 0,38 µg/Kg da granja B.

Coleta (mês/2016)	Galpão		OVO							
	Temperatura (°C)	Ração	Ave	Código	Qualidade			Casca		Micotoxina
		Milho (safra)	Idade (semanas)		Total	Gema	Clara	%	Espessura (mm)	Aflatoxina (µg /Kg)
ABRIL	31	2015	33	3	53,609	14,967	33,184	10,2	0,4923	1,26
	31		34	7	57,442	17,079	34,665	9,9	0,4849	1,21
	31		34	8	59,345	16,625	36,736	10,1	0,4850	1,29
	31		34	9	57,983	16,361	35,806	10,0	0,4852	1,23
	30		36	17	62,284	20,302	35,847	9,8	0,3547	0,71
	30		36	19	55,019	16,197	33,100	10,4	0,3599	1,03
	23		37	23	54,724	16,621	31,511	12,0	0,3664	0,98
	23		37	25	54,595	16,587	31,637	11,7	0,3735	1,07
MAIO	21	2016	41	43	55,899	16,742	33,464	10,2	0,3642	0,76
JUNHO	21		42	47	47,037	17,408	23,705	12,6	0,3356	0,77
	22		44	57	56,756	17,873	33,344	9,8	0,3431	0,75
	17		45	65	61,067	19,415	35,188	10,6	0,4327	0,68
	26		46	67	61,040	19,015	35,390	10,4	0,3673	0,72
JULHO	23		47	73	62,904	19,608	36,919	10,1	0,3401	0,86
	24		49	84	60,154	18,987	34,773	10,6	0,3610	0,74
	24		49	85	63,966	19,063	38,289	10,3	0,3582	0,70

LD: 0,38 µg/Kg; LQ: 0,71 µg/Kg.

5 CONCLUSÃO

O imunoenensaio ic-ELISA desenvolvido é sensível, específico e com baixo limite de detecção e demonstrou ser eficiente para triagem de aflatoxina em ovo, possibilitando análise rápida, fácil e de baixo custo. O método requer menor uso de solvente orgânico em relação a métodos químicos tradicionais, e análise simultânea de 15 a 24 amostras em triplicata por microplaca.

REFERÊNCIAS

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual de 2017**. 2017.

ALCÂNTARA, J. B. Qualidade físico-química de ovos comerciais: avaliação e manutenção da qualidade. Seminário apresentado ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás, 2012.

ALLEONI, A. C. C.; ANTUNES, A. J.; Unidade Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.681-685, out./dez. 2001.

ALY, S.A., ANWER, W. Effect of naturally contaminated feed with aflatoxins on performance of laying hens and the carryover of aflatoxin B₁ residues in table eggs. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, n.2, p. 181 – 186, 2009.

ANFOSSI, L.; DI NARDO, F.; GIOVANNOLI, C.; PASSINI, C.; BAGGIANI, C. Enzyme immunoassay for monitoring aflatoxins in eggs. **Food Control**, v. 57, p. 115 – 121, 2015.

ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v.13, p. 173-183, 2002.

AMARAL, G.; GUIMARÃES, D.; NASCIMENTO, J. C.; CUSTÓDIO, S. Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **BNDES Setorial**, v. 43, p.167-207, 2016.

AMIRKHIZI, B.; AREFHOSSEINIB, S. R.; ANSARIN, M.; NEMATI, M. Aflatoxin B₁ in eggs and chicken livers by dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC. **Food Additives & Contaminants: Part B**. v. 8, n. 4, p. 245–249, 2015.

AZEVEDO, I. G.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C. R.; ALMEIDA, R. M. A.; SOUZA, V. M. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from maize. **Revista de Microbiologia**, n.25, v.1, p.46-50, 1994.

BAGATIN, A. K.; HASHIMOTO, E. H.; HIROOKA, E. Y.; KAWAMURA, O. The contamination with aflatoxins in Brazilian corn and feed for chickens and the risk evaluation. **Techn. Bull. Fac. Agriculture**, Kagawa Univ. v. 68, n. 121, p. 25-31, 2016.

BARKAI-GOLAN, R. **Aspergillus mycotoxins**. In: BARKAI-GOLAN, R.; PASTER, N. **Mycotoxins in fruits and vegetables**. Academic Press, Elsevier, San Diego, CA, p. 115-151. 2008.

BENITES, C. I.; FURTADO, P. B. S.; SEIBEL, N. F. Características e aspectos nutricionais do ovo. In: SOUZ-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: UFPEL, p 57-64. 2005.

BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA R.; SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. No prélogo. **International Journal of Food Microbiology**, 2007.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BINTVIHOK, A.; THIENGNIN, S.; DOI, K.; KUMAGAI, S. Residues of Aflatoxins in the Liver, Muscle and Eggs of Domestic Fowls. **J. Vet. Med. Sci.** v. 64, p. 1037–1039, 2002.

BOEMO, L. S.; KARKOW, A. K.; LUCCA, W.; ROSA, A.P.; LUZ, T.S.; POTTER, L.; SANTURIO, J. M. Estudo meta-analítico de diferentes níveis de aflatoxinas no desempenho de frangos de corte de 1 a 21 dias alojados em baterias. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2015. 43: 1317.

BORETTI, L. Micotoxinas em poedeiras. **Revista Avicultura Industrial**, São Paulo, n.1059, p. 41-44, set. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os Limites Máximos Tolerados (LMT) de Micotoxinas em Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF.14 dez. 1952. Atualizado em 1997. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/arq.../RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf> Acesso em: 23 de set. 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária e departamento de inspeção de produto de origem animal. Resolução nº 01, de 9 de janeiro de 2003. Aprova a uniformização da nomenclatura de produtos cárneos não formulados em uso para aves e coelhos, suídeos, caprinos, ovinos, bubalinos, equídeos, ovos e outras espécies de animais. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 2003. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis>> Acesso em: 10 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 7 de 09 de nov. de 1988. Regulamento de inspeção e fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 1988. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/arquivosislegis/anexos/rb/POR7_88_SFA_MAPA.pdf> Acesso em: 29 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 1 de 21/02/1990. Publicada em 06/03/1990. Oficializa as Normas gerais de inspeção de ovos e derivados.

Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 1990. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>> Acesso em: 07 ago. 2017.

BULLERMAN, L. B.; SCHROEDER, L. L.; PARK, K. Y. Formation and control of mycotoxins in food. **Journal of Food Protection**, v.47, n.8, p.637-646, 1984.

BUSBY, W. F.; WOGAN, G. N. **Aflatoxins**. In: **Mycotoxins and nitrosocompounds, environmental risks**. 1981, Boca Raton, FL. R. C. Shank, ed. CRC Press Inc., Boca Raton: 1981. v.2, p.3-27, 1981.

CALLERI, E.; MARRUBINI, G.; BRUSOTTI, G.; MASSOLINI, G.; CACCIALANZA, G. Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the online solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p. 396 – 403, 2007.

CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa, n.139, 191p. 2003.

CARVALHO, M. G. **Influência do processamento de antioxidants e da estocagem sobre a oxidação lipídica do ovo**. 155 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP. 2012.

CARVALHO, L.S.S.; FERNANDES, E.A. Formação e qualidade da casca de ovos de reprodutoras e poedeiras comerciais. **Medicina Veterinária**. Recife, v.7, n.1, p. 35 - 44, 2013.

CHO, S.-H.; LEE, C.-H.; JANG, M.-R.; SON, Y.-W.; LEE, S.-M.; CHOI, I.-S.; KIM, S.-H.; KIM, D.-B. Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. **Food Chemistry**, v.107 p. 1283–1288, 2008.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. **Mutation Research**, v. 259, n. 3-4, p. 291-306, 1991.

CRAWFORD, J. M.; KORMAN, T. P.; LABONTE, J. W.; VAGSTAD, A. L.; HILL, E. A.; KAMARI-BIDKORPEH, O.; TSAI, S.; TOWNSEND, C. A. Structural basis for biosynthetic programming of fungal aromatic polyketide cyclization. **Nature**, v. 461, n.22, p. 1139-1144, 2009.

CLOSA, S. J.; MARCHESICH, C.; CABRERA, M.; MORALES, J. C. M. Composición de huevos de gallina y codorniz. **Archivos Latinoamericanos de nutrición**, Caracas, v. 49, n.2. 1999. Disponível em: <http://www.alanrevista.org/ediciones/1999-2/composicion_huevos_gallina_codorniz.asp>. Acesso em: 10 set. 2015.

CORRIER, D. E. Micotoxicoses: Immunossuppression of mechanisms. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p.73-87, 1991.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, p. 103-143, 1991.

COULOMBE, R.A. Biological action of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.880-891, 1993.

DAVIS, C.; REEVES, R. High value opportunities from the chicken egg. **Rural Industries Research and Development Corporation**, n. 02/094, 2002.

DORNER, J. W. Management and prevention of in peanuts. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.2, p.203-208, 2008.

EDINBORO, L. E.; KARNES, H. T. Determination of aflatoxins B1 in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extration coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1083, p.127-132, 2005.

FENNEMA, O. R. **Principles of food science**, Food Chemistry Part I, Marcel Decker. Inc, pp. 660-673. 1976.

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F.; GATTI, M. J.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. R. Potential aflatoxin and ochratoxin a production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**. v. 31, p. 343–353, 2007.

FREDRIKSSON, S.; ELWINGER, K.; PICKOVA, J. Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. **Food chemistry**. v. 99, p. 530-537, 2006.

FUJII, S.; GARCIA, L.B.; HIROOKA, E.Y. Metodologia analítica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. **Alimentos e Nutrição, Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 15, n.3, p.273-284, 2004.

GAMA, N. M. S. Q. **Salmonella spp em aves de postura comercial**. 2001. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.

GARCIA, D., BARROS, G., CHULZE, S., RAMOS, A.J., SANCHIS, V., MARIN, S. Impact of cycling temperatures on *Fusarium verticillioides* and *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins production in soybean. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 92, p. 2952 – 2959, 2012.

GARLICH, J.D.; TUNG, H.T.; HAMILTON, P.B. The effects of short term feeding of aflatoxin on egg production and some plasma constituents of the laying hen. **Poultry Science**, v.52, p.2206-2211, 1973.

GHOSH, R. C. Immunosupression in broiler under experimental aflatoxicosis. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 146, p. 457-462, 1990.

GOTO, T.; WICKLOW, D.T.; ITO, Y. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by asclerotium-producing *Aspergillus tamaris* strain. **Applied Environmental Microbiology**, v.62,p. 4036–4038, 1996.

HERZALLAH, S.M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chem.** v. 114, p. 1141–1146, 2009.

HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S.; TAKABAYASHI-YAMASHITA, C. R.; ISHIKAWA, A. T.; SABINO, M.; ITANO, E. N.; KAWAMURA, O. In: **Food Production and Industry**, Ed. Eissa, A. A. (Ed.). Safety and quality in agricultural product chain in Brazil. p. 137-165, 2015.

HOERR, F. J. Mycotoxicoses. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. **Diseases of Poultry**, 10th ed. Oowa State University Press, 1080p, 1997.

HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; JONES, F. T.; HAGLER, W. H. progression of aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v.65, p. 1891- 1899, 1986.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatística da produção pecuária – Setembro de 2017**. 2017.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal de 2015**. v.43, 2016.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2002. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Stryrene. **International Agency for Research on Cancer**, Lyon, France, v. 82, p.171-300, 2002.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE- 008 – Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos**. Revisão 02, 2007.

ISHIKAWA, A. T.; TAKABAYASHI-YAMASHITA, C. R.; ONO, E. Y. S.; BAGATIN, A. K.; RIGOBELLO, F. F.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ITANO, E. N. Exposure Assessment of Infants to Aflatoxin M₁ through Consumption of Breast Milk and Infant Powdered Milk in Brazil. **Toxins**. 2016, 8, 246.

JAIMEZ, J.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M. CEPEDA, A. MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal Chromatography**, v.882, p.1-10, 2000.

JIA, R.; MA, Q.; FAN, Y.; JI, C.; ZHANG, J.; LIU, T.; Zhao, L. The toxic effects of combined aflatoxins and zearalenone in naturally contaminated diets on laying performance, egg quality and mycotoxins residues in eggs of layers and the protective effect of *Bacillus subtilis* biodegradation product. **Food and Chemical Toxicology**. v. 90, p. 142 – 150, 2016.

KANA, J. R.; GNONLONFIN, B. G. J.; HARVEY, J.; WAINAINA, J.; WANJUKI, I.; SKILTON, R. A.; TEGUIA, A. Assessment of aflatoxin contamination of maize, peanut meal and poultry feed mixtures from different agroecological zones in cameroon. **Jornal Toxins**. v. 5, p. 884-894, 2013.

KAWAMURA, O.; NAGAYAMA, S.; SATO, S.; OHTANI, K.; UENO, I.; UENO, Y. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B1 in peanut products. **Mycotoxin Research**, v.4, p.75-87, 1988.

KLICH, M.A.; MULLANEY, E.J.; DALY, C.B.; CARY, J.W. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamarii* and *A. ochraceoroseus*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.605–609, 2000.

KLICH, M. A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**. n.8. p. 713-722, 2007.

KOTTWITZ, L.B.M., LEÃO, J.A., BACK, A., RODRIGUES, D.P., MAGNANI, M., OLIVEIRA, T. C. R. M. Commercially laid eggs versus discarded hatching eggs: contamination by *Salmonella* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, p.367 - 370, 2013a.

KOTTWITZ, L.B.M., SCHEFFER, MC, COSTA, L. M. D., LEÃO, J.A., BACK, A., RODRIGUES, D.P., MAGNANI, M, OLIVEIRA, T.C.R.M. Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipagem e caracterização molecular de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola. *Semina. Ciências Agrárias*, v.33, p.705 - 712, 2012.

KOTTWITZ, L.B.M., SCHEFFER, M.C., DALLA-COSTA, L.M., FARAH, S.M.D.S.S., MOSCALEWSKI, W.S.B., MAGNANI, M., OLIVEIRA, T.C.R.M. Molecular characterization and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. v.60, p.1026 - 1031, 2011.

KOTTWITZ, L. B. M., OLIVEIRA, T.C.R.M., ALCOCER, I.R.N., FARAH, S.M.S.S., MOSCALEWSKI, W.S., RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v.32, p.9 - 15, 2010.

KOTTWITZ, L.B.M., BACK, A., OLIVEIRA, T.C.R.M. Contaminação por *Salmonella* em uma Cadeia de Produção de Ovos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.60, p.496 - 498, 2008.

LANA, G.R.Q. **Avicultura**. Campinas: Livraria e Editora Rural Ltda, 2000. 253p.

LARRAÑAGA, I. J.; CARBALLO, J. M; RODRIGUEZ, M. M.; FERNÁNDEZ, J. A. Características, modificaciones y alteraciones de huevos y ovoproductos, **Control e Higiene de los Alimentos**, Ciclo Formativo Grado Superior, pp. 357-372, 1999.

LAZZÁRI, F. A. **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações**. 2 ed. Curitiba. Ed. Do Autor, p. 73-123, 1997.

LEANDRO, N. S. M.; DEUS, H. A. B.; STRINGHINI, J. H.; CAFÉ, M. B.; ANDRADE, M. A.; CARVALHO, F. B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na Região de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, p. 71-78, 2005.

LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, p. 352, 1995.

LI, P., ZHANG, Q., ZHANG, W. Immunoassays for aflatoxins. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 1115-1126, 2009.

LINDEN, G.; LORIENT, D.. Egg Products. **In New Ingredients in Food Processing: Biochemistry and Agriculture**; Woodhead Publishing Ltd., Cap. 6, 1999.

LOTZSCH, R.; LEISTNER, L. Aflatoxin – Rückstände in Huhnereiern und Eiprodukten. **Fleischwirtschaft**, v. 12, 1777 -1785, 1976.

IQBAL, S. Z.; NISAR, S.; ASI, M.R.; JINAP, S. Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. **Food Control**. v. 43, p. 98–103, 2014.

MACHINSKI, M.J.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J.L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **J. Scien. Food Agricult.** v.81, p.1001-1007, 2001.

MACRAE, R.; ROBINSON, R. K.; SADDLER, M.J. Wine: **In Encyclopaedia of Food Science and Technology**, vol. 7, Harcourt Brace, London, 1993.

MARAGOS, C. M.; APPELL, M.; LIPPOLIS, V.; VISCONTI, A.; CATUCCI, L.; PASCALE, M. Use of ciclodextrins as modifiers of fluorescence in the detection of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n.2, p.164-171, 2008.

MARIN, D. E. Changes in performance, blood parameters, humoral and celular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. **Rev. American. Society of Animal Science**, v. 80, n.5, p. 1250-1257, 2002.

MARIN, S., RAMOS, A.J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.

MAZIEIRO, T. M.; BERSOT, L.S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil – A Review. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010

MCLEAN, M.; DUTTON, M. F. Cellular interacions and metabolism of aflatoxin: an update. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.65, p.163- 192, 1995.

MEDEIROS, F. M.; ALVES, M. G. M. Qualidade de ovos comerciais. **Revista eletrônica Nutitime**, v.11, n. 4, p. 3515- 3524, 2014.

MENDES, F. R. **Qualidade física, química e microbiológica de ovos lavados armazenados sob duas temperatuas e experimentalmente contaminados com *Pseudomonas aeruginosa***. 2010.72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

MENDY, M.; WALTON, R. Molecular pathogenesis and early detection of hepatocellular carcinoma – Perspectives from West Africa. **Cancer Letters**, v.236, p.44-51, 2009.

MERKLEY, J. W.; MAXWELL, R. J.; PHILLIPS, J. G.; HUFF, W. E. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. **Poultry Science**, v. 66, p. 59-64, 1987.

NA, J. C.; SONG, J. Y.; LEE, B. D.; LEE, S. J.; LEE, C. Y.; AN, G. H.. Effect of polarity on absorption and accumulation of carotenoids by laying hens. **Animal Feed and Technology**, n. 117, p. 305-315, 2004.

OFFICIAL JOURNAL OF EUROPEAN COMMUNITIES. EC 401/2006 – Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. February, 23th. 2006.

OLIVEIRA, C.A.F.; KOBASHIGAWA, E.; REIS, T.A.; MESTIERI, L.; ALBUQUERQUE, R.; CORREA, L.M.B. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. **Food Addit Contam.** v. 17, p. 459–462, 2000.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R. G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e *Elisa* na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 369-374, 2000.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu desenvolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista Saúde Pública**, v.31, n. 4, p.417-424, 1997.

ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E; OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. **Food Additives and Contaminants.** v.18, p. 719-729, 2001. DOI:10.1080/02652030118906.

ONO, E. Y. S.; BIAZON, L.; FUJII, S.; ONO, M. A.; HIROOKA, E. Y. Advances immunochemical methods for mycotoxin/mycotoxigenic fungi detection in the agri-food sistem. In: B. N. Ganguli and S K Deshmukh. (org). *Fungi: Multifaceted Microbes*. New Delhi: Anamaya Publishers, p. 275-293, 2006b.

OPAS. **Micotoxinas**. Criterios de Salud Ambiental, 11. Whashington, p. 131, 1983.

PARK, D.L.; POHLAND, A.E. A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds. **Mycotoxins and Phycotoxins**, edited by P. S. Steyn and R. Vlegaar .Amsterdam: Elsevier Applied Science. p. 473 - 482, 1986.

PESTKA, J. J.; BONDY, G. S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. **Canadian Journal Phisiology and Pharmacology**, v.68, p.1009-1016, 1990.

PETERSON, S.W.; ITO, Y.; HORN, B.W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, v.93, p.689–703, 2001.

PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3964-3967, 1992.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and Food Spoilage*. 3 ed. New York. Springer. 2009.

PRATHAPKUMAR H.; SHETTY-RAMESH V.; BHAT. Natural Occurrence of Fumonisin B1 and Its Co-occurrence with Aflatoxin B1 in Indian Sorghum, Maize, and Poultry Feeds. **J. Agric. Food Chem.**v. 45, p. 2170-2173, 1997.

QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; VALDIVIA, A. G.; REYES, J. L. effects of aflatoxin B₁ on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 125, n. 3, p. 265-272, 2000.

RAMOS, B. F. S. **Gema de ovo composição em aminas biogénicas e influência da gema na fração volátil de creme de pasteleiro**. 2008.111p. Dissertação (Mestrado em Controle de qualidade) – Faculdade de farmácia, Universidade do Porto, Porto.

RAMOS, A. J.; HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine. **Mycopathologia**, v.134, p.27-30, 1996.

RAWAL, S., KIM, J.E., COULOMBE, R.A.J. Aflatoxin B₁ in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.325-331, 2010.
REGENSTEIN, J. M.; REGENSTEIN, C. E. Food protein chemistry: an introduction for food scientists. **Food science and Technology**. A series of Monographs, cap. 6, pp. 43-48, 1984.

RÊGO, I.O.P.; CANÇADO, S.V; FIGUEIREDO, T.C.; MENEZES, L.D.M.; OLIVEIRA, D.D.; LIMA, A.L.; CALDEIRA, L.G.M.; ESSER, L.R. Influência do período de armazenamento na qualidade do ovo integral pasteurizado refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n.3, p.735-742. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352012000300027&script=sci_arttext.> Acesso em: 10 set. 2015.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. Salmonella spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the Salmonella Isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 296-299, 2007.

ROSSI, C. N.; TAKABAYASHI, C. R.; ONO, M. A.; BORDINI, J. G.; KAWAMURA, O.; VIZONI, E.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Assessment of exposure of broiler chicken in Brazil to mycotoxins through naturally contaminated feed. **Food Security**. v. 5, P. 541 – 550, 2013. DOI: 10.1007/s12571-013-0278-4.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation, and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

VILELA, D. R. **Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais com casca normal e vítrea**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais. 2012.

SALVADOR, E. L. **Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais armazenadas em diferentes temperaturas e períodos de estocagem**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, Alagoas. 2011.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira Ciência Avícola**, v.2, n.1, p.01-12, 2000.

- SANTURIO, J. M. O uso correto de adsorventes para micotoxinas. In: III Encontro técnico sobre avicultura de corte da região de Descalvado. Descalvado, 1999. **Anais...** Descalvado, 1999. p.28-45.
- SAWHNEY, D. S.; VADEHRA, D. V.; BAKER, R. C. Aflatoxicosis in the laying japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Poultry Science**, v. 52, n. 2; p. 465-473, 1973.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Editora Insular, 1998, 144 p
- SEIBEL, N. F. Transformações bioquímicas durante o processamento do ovo. In: SOUZ-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: UFPEL, p 77-90, 2005.
- SEKIYAMA, B.L.; RIBEIRO, A.B.; MACHINSKI, P.A.; JUNIOR, M.M. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. *Braz. J. Microbiol.* v.36, p.289-294, 2005.
- SHIMA, Y.; SHIINA, M.; SHINOZAWA, T.; ITO, Y.; NAKAJIMA, H.; ADACHI, Y.; YABE, K. Participation in aflatoxin biosynthesis by a reductase enzyme encoded by *vrDA* gene outside the aflatoxin gene cluster. **Fungal Genetics and Biology**, v.46, p. 221-231, 2009.
- SYDENHAM, E.W.; MARASAS, W.F.O.; SHEPARD, G.S.; THIEL, P.G.; HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.40, p. 994-997, 1992. DOI: 10.1021/jf00018a016.
- SILOTO, E. V. **Desempenho, qualidade de ovos e metabolismo lipídico de poedeiras comerciais alimentadas com dietas contendo aflatoxina, fumonisina e adsorvente**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade estadual paulista faculdade de medicina veterinária e zootecnia Campus de Botucatu. 2010.
- SOARES, A. K. P. **Avaliação da qualidade de ovos de galinha comercializados em Campos dos Goytacazes – RJ**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. 2007.
- SOUZA, M. L. M.; SULLYOK, M.; SILVA, O. F.; COSTA, S. S.; BRABET, C.; MACHINSKI, J. M.; SEKIYAMA, B. L.; VARGAS, E. A.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **The Scientific World Journal**. p. 1-9, 2013.
- SQUIRE, R.A. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science*, v.214,p. 877–880, 1981.
- SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.141–158, 1998.
- TABARI, M.; KARIM, G.; GHAVAMI, M.; CHAMANI, M. Validation for aflatoxin M1 determination in yoghurt using immunoaffinity column clean-up prior to high-performance liquid chromatography. *Toxicol Ind Health*, v. 27, n. 7, p.629-635, 2011.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. L. S. P.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Efeitos da aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre os níveis séricos de aspartato amino-transferase e proteína total de frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p. 185-189, abr./jun., 2005.

TESSARI, E.N.C., CARDOSO, A.L.S.P. Efeitos da aflatoxina sobre as aves: Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano IX, n. 18, 2012. TERNES, W., “Egg lipids”. In Chemical and Functional Properties of Food Lipids. **CRC Press LLC**, cap.14, 2003.

TURNER, N.W., SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v.632 n. 2, p. 168-180, 2009.

TRUCKSESS, M. W.; STOLOFF, L.; YOUNG, K.; WYATT, R. D. ; MILLER, B.L. Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. **Poultry Science**. v. 62, p. 2176 – 2182, 1983.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Egg-Grading Manual. Washington. n.75, 2000. Disponível em:<<http://www.ams.usda.gov/AMSv1.0/getfile?dDocName=STELDEV3004502>> Acesso em: 13 set. 2015.

VILELA, D. R. **Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais com casca normal e vítrea**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, Minas Gerais. 2012.

VILELA, D. R.; CARVALHO, L. S. S.; FAGUNDES, N. S.; FAGUNDES, E. A. Qualidade interna e externa de ovos de poedeiras comerciais com cascas normal e vítrea. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v.17, n.4, p. 509-518, 2016.

YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p.194-202, 2005.

WANG, J.S.; QIAN, G-S.; ZARBA, A.; HE, X.; ZHU, Y-R.; ZHANG, B-C.; JACOBSON, L.; GAUGE, S.J.; MUÑOZ, A.; KENSLER, T.W.; GROOPMAN, J.D. Temporal Patterns of Aflatoxin-Albumin Adducts in Hepatitis B Surface Antigen-positive and Antigen-negative Residents of Daxin, Qidong County, People’s Republic of China. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**.v.5, p.253-261, 1996.

WASHBURN, K.W.; WYATT, R. D.; POTTS, P. L.; LANZA, G. M. Effects and mechanism of aflatoxin on variation in shell strength. **Poultry Science**, v. 64, n. 7, p. 1302-1305, 1985.

WOLZAK, A.; PEARSON, A. M.; COLEMAN, T. H.; PESTKA, J.J.; GRAY, J.I. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. **Food and Chemical Toxicology**. v. 23, p. 1057 – 1061, 1985.

WYATT, R. D. Poultry. In: SMITH J. E. & HENDERSON, R. S. (Ed). **Mycotoxins and animal foods**. Athens CRC Press, 1991. cap. 24, p. 553-605, 1991.

XAVIER, I.M.C.; CANÇADO, S.V.; FIGUEIREDO, T.C. *et al.* Qualidade de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, p.953-959, 2008.

XIULAN, S.; XIAOLIAN, Z.; JIAN, T.; XIAOHONG, G.; JUN, Z.; CHU, F. S. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B1 in foods. **Food Control**, v. 17, p. 256-262, 2006.

ZINEDINE, A.; JUAN, C.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; IDRISSE, L.; MAÑES, J. Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 124–127, 2007.

ANEXO

Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A.

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA					
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)	AFLATOXINA (µg /Kg)
1	51,592	14,128	32,033	10,53	0,4916	ND
2	53,731	14,034	34,268	10,10	0,4878	ND
3	59,928	15,680	38,389	9,78	0,4884	ND
4	53,514	15,030	33,043	10,17	0,4881	ND
5	54,685	15,014	32,953	12,28	0,4869	ND
6	53,947	14,832	32,558	12,15	0,4881	ND
7	51,701	13,943	32,267	10,62	0,4879	ND
8	53,989	14,146	33,274	12,17	0,4882	ND
9	52,119	13,655	32,113	12,19	0,4909	ND
10	54,745	13,610	35,510	10,27	0,4873	ND
11	55,124	15,648	33,965	10,00	0,4853	0,70
12	54,467	14,994	34,198	9,69	0,4838	ND
13	54,452	14,804	34,195	10,01	0,4887	0,69
14	50,632	17,945	27,766	9,72	0,4851	ND
15	54,456	18,255	30,575	10,33	0,4244	ND
16	55,717	16,121	34,153	9,77	0,4161	ND
17	54,743	16,279	32,997	9,99	0,3883	ND
18	54,028	15,071	33,687	9,75	0,4095	0,77
19	51,376	14,886	31,322	10,06	0,4135	ND
20	51,267	14,801	31,371	9,94	0,4114	ND
21	55,144	14,880	34,768	9,97	0,4174	ND
22	52,547	14,822	32,604	9,75	0,4024	ND
23	53,103	15,697	32,112	9,97	0,4136	ND
24	55,294	14,976	34,583	10,37	0,4172	ND

Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
25	55,116	15,167	34,577	9,75	0,4035	ND	
26	53,477	14,055	34,138	9,88	0,4285	ND	
27	53,045	15,143	32,291	10,58	0,4315	0,86	
28	53,092	14,380	33,101	10,57	0,4276	0,81	
29	49,960	14,052	30,605	10,61	0,4154	ND	
30	52,343	15,032	31,789	10,55	0,4423	0,85	
31	57,590	15,306	36,115	10,71	0,4085	ND	
32	54,209	16,601	31,855	10,61	0,3725	ND	
33	55,659	15,698	34,119	10,50	0,3683	ND	
34	60,158	15,662	38,337	10,24	0,372	0,73	
35	54,925	16,403	32,648	10,69	0,386	ND	
36	55,983	15,077	34,973	10,60	0,3859	ND	
37	54,435	15,209	33,463	10,59	0,3604	ND	
38	55,396	15,650	34,077	10,23	0,3472	ND	
39	53,747	14,732	33,281	10,67	0,3762	ND	
40	55,829	15,691	34,508	10,09	0,3571	ND	
41	54,944	16,456	32,611	10,70	0,3786	0,8	
42	53,117	15,815	30,382	13,03	0,3782	ND	
43	54,957	16,533	31,637	12,35	0,3743	ND	
44	55,569	15,976	32,679	12,44	0,3748	ND	
45	56,491	15,626	33,948	12,25	0,3598	1,01	
46	52,936	15,991	31,544	10,20	0,347	ND	
47	53,920	15,422	31,687	12,63	0,372	ND	
48	55,784	17,026	31,727	12,60	0,3711	0,72	
49	53,452	15,572	30,526	13,76	0,3616	ND	
50	54,686	14,833	33,658	11,33	0,3633	ND	

Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
51	55,066	18,293	30,847	10,76	0,3533	ND	
52	57,510	17,081	34,481	10,34	0,357	ND	
53	58,353	16,807	35,410	10,51	0,3667	ND	
54	57,474	17,402	34,017	10,53	0,3565	0,88	
55	55,265	16,526	31,793	12,57	0,3562	ND	
56	59,442	15,440	38,862	8,65	0,3124	ND	
57	58,582	15,293	37,124	10,52	0,3376	ND	
58	54,185	15,902	32,407	10,84	0,3646	ND	
59	53,205	18,718	29,861	8,70	0,365	ND	
60	54,932	16,750	32,461	10,42	0,349	ND	
61	53,360	16,125	31,579	10,60	0,4106	ND	
62	54,557	15,759	32,778	11,03	0,4063	ND	
63	54,421	17,606	31,013	10,66	0,3842	ND	
64	54,634	16,543	32,345	10,52	0,3795	ND	
65	52,834	15,573	31,780	10,37	0,325	ND	
66	54,189	16,058	31,749	11,78	0,3251	ND	
67	52,997	16,169	31,074	10,86	0,3341	ND	
68	53,694	16,819	31,188	10,59	0,3321	ND	
69	52,247	14,878	31,785	10,69	0,3372	ND	
70	55,938	17,216	33,294	9,70	0,3473	ND	
71	52,611	15,296	31,614	10,84	0,3511	ND	
72	55,370	16,320	33,023	10,88	0,3673	ND	
73	52,033	15,450	31,100	10,54	0,3494	ND	
74	55,687	15,614	34,210	10,53	0,356	ND	
75	51,598	15,091	30,707	11,24	0,3642	ND	
76	52,636	15,921	31,038	10,79	0,3523	ND	

Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
77	54,649	15,570	33,368	10,45	0,341	ND	
78	52,997	16,031	31,504	10,31	0,3473	ND	
79	53,983	16,399	31,910	10,51	0,3581	ND	
80	55,198	16,196	33,289	10,35	0,3396	ND	
81	53,852	16,381	31,876	10,39	0,34	0,78	
82	53,405	15,822	31,944	10,56	0,3454	ND	
83	55,437	17,010	32,704	10,32	0,3411	ND	
84	56,519	16,696	34,147	10,04	0,3314	ND	
85	53,810	15,828	32,355	10,46	0,3586	ND	
86	60,008	16,490	37,601	9,86	0,335	ND	
87	58,176	17,006	35,173	10,31	0,3481	ND	
88	53,191	15,407	32,194	10,51	0,3451	ND	
89	53,284	16,611	31,049	10,55	0,3451	ND	
90	56,382	16,062	34,330	10,62	0,3497	ND	
91	51,397	14,557	31,440	10,51	0,3391	ND	
92	52,498	16,443	30,539	10,51	0,3397	ND	
93	54,262	16,178	32,143	10,95	0,3668	ND	
94	54,828	16,443	32,913	9,98	0,3258	ND	
95	55,822	16,789	32,965	10,87	0,3633	ND	
96	54,931	15,998	32,982	10,83	0,3478	ND	
97	52,248	14,525	32,093	10,78	0,3469	ND	
98	53,350	15,372	32,365	10,52	0,3416	ND	
99	52,462	16,322	30,520	10,71	0,3577	ND	
100	55,656	16,546	34,511	8,26	0,3577	ND	
101	53,696	16,052	31,831	10,83	0,3346	ND	
102	54,604	16,417	32,482	10,45	0,3231	1,12	

Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
103	52,776	15,047	32,088	10,69	0,3014	ND	
104	54,443	16,095	32,852	10,10	0,3091	ND	
105	58,042	17,404	34,643	10,33	0,3398	ND	
106	56,240	17,487	33,008	10,22	0,3172	ND	
107	55,039	16,775	32,442	10,58	0,3238	ND	
108	56,253	16,379	33,864	10,68	0,325	ND	
109	54,674	16,122	32,820	10,49	0,3164	0,93	
110	56,081	17,270	32,962	10,43	0,3427	ND	
111	51,669	16,331	30,191	9,96	0,3422	ND	
112	54,277	15,810	33,975	8,27	0,3262	ND	
113	53,276	17,913	30,864	8,45	0,3326	ND	
114	53,154	16,284	32,203	8,78	0,3285	ND	
115	55,647	16,758	34,186	8,45	0,3312	ND	
116	53,292	17,346	31,312	8,69	0,3363	ND	
117	53,446	16,203	32,578	8,73	0,3656	ND	
118	56,061	17,647	33,720	8,37	0,3578	ND	
119	54,156	17,205	32,563	8,10	0,3576	ND	
120	56,566	18,588	33,404	8,09	0,3541	ND	
121	55,365	17,023	32,545	10,47	0,3957	ND	
122	58,651	17,845	34,913	10,05	0,4044	ND	
123	56,020	16,860	33,360	10,35	0,4125	ND	
124	55,986	18,024	32,185	10,32	0,4033	ND	
125	58,943	18,110	34,772	10,28	0,4022	ND	
126	58,999	18,050	35,085	9,94	0,4061	ND	
127	54,601	17,519	31,188	10,80	0,4205	ND	
128	54,858	17,935	31,045	10,72	0,4211	ND	

Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
129	56,060	17,372	32,822	10,46	0,405	ND	
130	54,288	17,080	31,561	10,40	0,4078	ND	
131	68,221	18,239	43,852	8,98	0,3476	ND	
132	55,720	17,011	32,844	10,53	0,3738	0,84	
133	60,313	17,665	36,340	10,46	0,3584	0,78	
134	58,866	18,681	34,181	10,20	0,3657	ND	
135	59,836	18,631	34,983	10,40	0,3551	ND	
136	60,878	18,623	36,011	10,26	0,383	ND	
137	60,978	17,677	36,735	10,77	0,3853	ND	
138	59,882	18,258	35,460	10,29	0,3645	ND	
139	61,948	18,089	37,230	10,70	0,3814	ND	
140	63,737	17,217	39,931	10,34	0,3708	ND	
141	55,833	17,114	32,640	10,89	0,3621	ND	
142	59,058	17,854	34,920	10,64	0,3738	ND	
143	60,733	19,770	34,729	10,26	0,3666	ND	
144	59,346	17,790	35,122	10,84	0,3844	ND	
145	54,882	15,973	32,984	10,80	0,3723	ND	
146	61,854	17,842	37,515	10,50	0,3732	ND	
147	59,399	17,200	35,851	10,69	0,371	ND	
148	60,716	18,860	35,565	10,36	0,3593	ND	
149	47,601	14,936	27,480	10,89	0,354	ND	
150	45,323	14,202	26,133	11,01	0,3613	ND	
151	55,691	16,217	33,585	10,58	0,3506	ND	
152	61,473	18,632	36,552	10,23	0,3577	ND	
153	60,778	18,693	35,709	10,49	0,3692	ND	
154	58,633	17,622	34,961	10,32	0,3489	ND	

Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
155	59,470	18,580	34,856	10,15	0,3579	ND	
156	58,928	18,599	34,313	10,21	0,3515	ND	
157	58,948	17,691	35,076	10,49	0,3597	ND	
158	58,164	18,858	33,058	10,74	0,3598	ND	
159	57,138	16,778	34,643	10,01	0,3543	ND	
160	57,740	17,883	33,622	10,80	0,3637	ND	
161	56,855	17,725	33,287	10,28	0,3264	ND	
162	59,662	16,906	36,811	9,96	0,3242	ND	
163	59,211	17,717	35,496	10,13	0,3265	ND	
164	57,904	17,392	34,533	10,33	0,3341	ND	
165	58,474	17,811	34,868	9,91	0,3351	ND	
166	56,696	17,511	33,128	10,68	0,3515	ND	
167	60,737	18,502	36,209	9,92	0,3361	ND	
168	59,497	18,367	35,198	9,97	0,3496	ND	
169	62,270	18,176	37,742	10,20	0,3542	ND	
170	64,989	19,926	38,844	9,57	0,3363	ND	
171	63,464	18,710	38,529	9,81	0,3357	ND	
172	63,172	19,418	38,767	7,89	0,3455	ND	
173	60,109	18,827	35,169	10,17	0,3509	ND	
174	60,399	18,283	36,092	9,97	0,3362	ND	
175	63,427	19,377	37,792	9,87	0,3388	ND	
176	63,839	18,557	38,981	9,87	0,3629	ND	
177	62,314	18,911	37,178	9,99	0,3631	ND	
178	58,743	18,942	33,424	10,86	0,3784	ND	
179	59,257	17,194	36,165	9,95	0,3355	ND	
180	58,672	18,081	34,797	9,88	0,3178	ND	

Tabela 14. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja A (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
181	57,078	17,386	33,756	10,40	0,3326	ND	
182	58,178	17,801	34,281	10,48	0,3206	ND	
183	58,269	17,608	34,465	10,63	0,3374	ND	
184	58,574	17,699	34,462	10,95	0,3713	ND	
185	58,686	17,515	35,151	10,26	0,3317	ND	
186	58,832	17,692	34,978	10,47	0,3434	ND	
187	58,109	18,284	33,899	10,20	0,3211	ND	
188	60,400	18,204	35,677	10,79	0,3532	ND	
189	60,557	18,327	36,047	10,21	0,3402	ND	
190	56,257	18,221	32,266	10,26	0,3213	0,86	
191	56,302	16,661	33,660	10,62	0,3535	ND	
192	56,553	16,710	33,943	10,43	0,3513	ND	
193	59,180	18,104	34,918	10,41	0,3469	ND	
194	58,489	17,775	34,619	10,42	0,3565	ND	
195	56,434	21,245	27,439	13,73	0,3568	ND	
196	61,541	17,555	37,595	10,38	0,3488	ND	
197	61,984	18,947	36,532	10,49	0,3573	ND	
198	59,343	17,807	35,397	10,35	0,3395	ND	
199	62,406	18,553	37,424	10,30	0,3659	ND	
200	57,916	16,068	37,073	8,25	0,3505	ND	

Tabela 15. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja B.

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA					AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)	
1	57,673	16,517	35,600	9,64	0,4862	ND
2	56,702	15,771	35,331	9,88	0,4896	ND
3	53,609	14,967	33,184	10,18	0,4923	1,26
4	55,413	15,898	33,824	10,27	0,4924	ND
5	55,041	14,683	34,761	10,17	0,4875	ND
6	56,434	17,003	33,754	10,06	0,4800	ND
7	57,442	17,079	34,665	9,92	0,4849	1,21
8	59,345	16,625	36,736	10,08	0,4850	1,29
9	57,983	16,361	35,806	10,03	0,4852	1,23
10	55,802	16,473	33,707	10,08	0,4880	ND
11	56,434	18,178	32,216	10,70	0,3574	ND
12	57,442	17,241	34,054	10,70	0,3912	ND
13	59,345	16,224	38,220	8,26	0,3768	ND
14	57,983	16,123	37,084	8,24	0,3725	ND
15	55,802	16,828	33,137	10,46	0,3594	ND
16	56,768	16,502	34,211	10,67	0,3568	ND
17	62,284	20,302	35,847	9,85	0,3547	0,71
18	55,439	16,578	32,880	10,79	0,3778	ND
19	55,019	16,197	33,100	10,40	0,3599	1,03
20	59,495	16,524	36,428	11,00	0,3824	ND
21	55,869	16,340	33,611	10,59	0,3787	ND
22	55,931	16,177	34,650	9,13	0,3615	ND
23	54,724	16,621	31,511	12,05	0,3664	0,98
24	55,208	16,050	33,645	9,99	0,3723	ND
25	54,595	16,587	31,637	11,67	0,3735	1,07
26	60,322	14,745	40,550	8,33	0,3534	ND

Tabela 15. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja B (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
27	60,121	17,520	37,494	8,49	0,3572	ND	
28	56,447	14,192	37,398	8,61	0,3619	ND	
29	58,725	19,444	34,423	8,27	0,3483	ND	
30	59,567	15,504	39,023	8,46	0,3415	ND	
31	60,024	18,524	35,177	10,53	0,3371	ND	
32	60,405	18,716	35,533	10,19	0,3456	ND	
33	60,974	19,485	35,197	10,32	0,3667	ND	
34	59,454	18,621	34,776	10,19	0,3496	ND	
35	62,928	19,799	36,891	9,91	0,3444	ND	
36	54,868	16,917	32,174	10,53	0,3566	ND	
37	60,931	18,979	35,599	10,43	0,3642	ND	
38	57,930	17,156	34,576	10,70	0,3736	ND	
39	79,114	18,315	54,296	8,22	0,3857	ND	
40	59,468	15,790	37,587	10,24	0,3654	ND	
41	58,973	16,588	36,525	9,94	0,3390	ND	
42	59,527	17,059	36,200	10,53	0,3477	ND	
43	55,899	16,742	33,464	10,18	0,3642	0,76	
44	58,090	16,704	35,341	10,41	0,3483	ND	
45	60,042	16,977	36,879	10,30	0,3562	ND	
46	56,350	17,064	33,470	10,32	0,3500	ND	
47	47,037	17,408	23,705	12,60	0,3356	0,77	
48	57,855	18,279	33,274	10,89	0,3519	ND	
49	59,763	17,631	35,916	10,40	0,3542	ND	
50	56,140	17,276	33,088	10,29	0,3535	ND	
51	56,738	19,291	31,437	10,59	0,3323	ND	
52	56,554	18,147	32,256	10,88	0,3587	ND	

Tabela 15. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja B (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						AFLATOXINA (µg /Kg)
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)		
53	59,016	17,961	34,650	10,85	0,3616	ND	
54	58,040	17,722	34,078	10,75	0,3562	ND	
55	59,066	17,972	34,830	10,61	0,3503	ND	
56	57,357	18,733	32,533	10,62	0,3648	ND	
57	56,756	17,873	33,344	9,76	0,3431	0,75	
58	59,724	19,538	33,745	10,78	0,3547	ND	
59	60,260	18,216	35,691	10,54	0,3593	ND	
60	61,586	19,559	35,547	10,52	0,3572	ND	
61	59,936	18,009	35,778	10,26	0,4178	ND	
62	59,559	19,704	33,634	10,44	0,4271	ND	
63	54,420	17,217	31,448	10,58	0,4067	ND	
64	58,506	19,016	33,384	10,44	0,4212	ND	
65	61,067	19,415	35,188	10,58	0,4327	0,68	
66	65,313	18,524	40,573	9,52	0,3483	ND	
67	61,040	19,015	35,681	10,39	0,3673	0,72	
68	56,739	18,594	31,926	10,96	0,3613	ND	
69	64,999	20,102	38,223	10,27	0,3694	ND	
70	61,033	20,055	34,766	10,18	0,3551	ND	
71	62,107	18,990	36,617	10,47	0,3576	ND	
72	55,958	17,843	32,025	10,88	0,3403	ND	
73	62,904	19,608	36,919	10,14	0,3401	0,86	
74	61,010	19,226	35,628	10,09	0,3298	ND	
75	57,646	17,133	34,306	10,77	0,3273	ND	
76	59,742	19,374	34,350	10,07	0,3439	ND	
77	58,632	18,730	33,636	10,69	0,3535	ND	
78	62,875	20,315	36,138	10,21	0,3558	ND	

Tabela 15. Parâmetros gerais de qualidade e segurança da granja B (continuação).

AMOSTRAS	PARÂMETROS DE QUALIDADE E SEGURANÇA						
	PESO DO OVO (g)	PESO DA GEMA (g)	PESO DA CLARA (g)	PERCENTUAL DE CASCA (%)	ESPESSURA DA CASCA (mm)	AFLATOXINA	
79	61,073	19,661	35,066	10,39	0,3688	ND	
80	63,669	19,916	37,545	9,75	0,3396	ND	
81	57,565	19,638	31,823	10,60	0,3488	ND	
82	61,206	20,153	34,753	10,29	0,3530	ND	
83	59,095	19,547	33,321	10,54	0,3692	ND	
84	60,154	18,987	34,773	10,63	0,3610	0,74	
85	63,966	19,063	38,289	10,34	0,3582	0,70	
86	61,167	16,960	37,823	10,44	0,3775	ND	
87	57,955	17,500	34,481	10,31	0,3551	ND	
88	57,406	17,543	33,866	10,45	0,3698	ND	
89	59,739	18,189	35,500	10,13	0,3638	ND	
90	58,142	17,220	34,867	10,41	0,3549	ND	
91	59,420	19,276	33,931	10,46	0,3349	ND	
92	58,587	17,488	35,000	10,41	0,3486	ND	
93	58,458	17,365	35,206	10,07	0,3326	ND	
94	60,323	17,732	36,461	10,16	0,3437	ND	
95	57,438	17,991	33,613	10,16	0,3357	ND	
96	59,843	19,371	34,429	10,10	0,3440	ND	
97	60,424	18,403	35,680	10,49	0,3791	ND	
98	58,763	19,060	33,495	10,56	0,3766	ND	
99	60,659	19,595	34,826	10,28	0,3384	ND	
100	62,645	19,069	37,280	10,05	0,3445	ND	

